

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche

Infettivologia ed Epidemiologia

sezione Virologia



Dottorato di ricerca in:

“Virologia fondamentale e clinica”

Ciclo 2003-2005

Lavoro di ricerca

***Prevalenza, natura e significato biologico
dei motivi CpG presenti nel genoma degli
anellovirus***

Il presidente del Dottorato

Chiar.mo Prof. Mauro Bendinelli

Dottoranda

Dr.ssa Letizia Lanini

INDICE

INDICE	1
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	4
RIASSUNTO	6
ABSTRACT	8
SEZIONE I: INTRODUZIONE	
Anellovirus	10
Tassonomia e nomenclatura	15
La particella virale	22
Genoma e proteine codificate	25
Eterogeneità genetica	36
La replicazione	40
Interazioni con l'ospite	43
Metodi per la rivelazione diagnostica	51
Epidemiologia	54
Associazione con la malattia	62
I motivi CpG nel DNA batterico e virale	69
Oligonucleotidi sintetici	74
Il recettore Toll-like 9 e la trasduzione del segnale	76
PREMESSE	82

DISEGNO E SCOPI DELLO STUDIO	83
SEZIONE II: MATERIALI E METODI	
Modello sperimentale	84
Preparazione del DNA virale	85
Metodica di amplificazione dell'isolato	87
Sequenziamento dell'isolato	89
Clonaggio	91
Estrazione plasmidica endotoxin free	97
Digestione plasmidica	99
Fase sperimentale	100
Preparazione dei complessi DNA-lipofectina	101
Estrazione dell'RNA totale	102
Real-time PCR	103
Analisi dell'espressione genica	109
Analisi statistica	110
SEZIONE III: RISULTATI	
1 Studio del numero dei motivi CpG	111
1.1 Numero dei motivi CpG per kb	111
1.2 Frequenza dei motivi CpG	115
2 Studio della natura dei motivi CpG	117
3 Studio della localizzazione genomica dei motivi CpG	122

4 Calcolo ed applicazioni dell'indice CpG	126
5 Isolamento e caratterizzazione di un isolato di TTV	133
6 Studio della cinetica d'espressione delle citochine	136
7 Stimolazione di cellule di milza di topo con DNA di TTV	140
8 Co-stimolazione delle cellule di milza di topo con DNA di TTV e ODN 1826	145
9 Interazioni del DNA virale con il recettore	149
 SEZIONE IV: DISCUSSIONE	
Discussione	152
 SEZIONE V: RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	
Riferimenti bibliografici	165
CURRICULUM	201

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

aa	aminoacido/i.
ALT	Alanine aminotransferase, alanina aminotransferasi.
CAV	Chicken anemia virus, virus dell'anemia del pollo.
IFN	Interferon, Interferone.
HBV	Hepatitis B virus, virus dell'epatite B.
HCV	Hepatitis C virus, virus dell'epatite C.
HIV	Human immunodeficiency virus, virus dell'immunodeficienza umana.
HVR	Hypervariable Region, regione ipervariabile.
LPS	Lipopolisaccaride.
nt	nucleotide/i.
ORF	Open Reading Frame, cornice di lettura aperta.
PCR	Polymerase chain reaction, reazione a catena della polimerasi.
PCV	Porcine circovirus, circovirus porcino.
RDA	Representational difference analysis, analisi di rappresentazione differenziale.
TLMV	TTV-Like-Mini-Virus.
TLR9	Toll-like receptor 9, recettore Toll-like 9

TTMV	TorqueTeno-Mini-Virus.
TTV	TorqueTeno virus.
UTR	Untraslated region, regione non tradotta.

Riassunto

TorqueTeno virus (TTV) è il prototipo di una vasta gamma di agenti virali con caratteristiche genomiche simili che vengono continuamente isolati nell'uomo e negli animali. Attualmente sono classificati in un nuovo genere chiamato *Anellovirus*.

Questi virus sono caratterizzati dalle piccole dimensioni della particella virale, dall'assenza di un involucro lipoproteico e da un genoma a DNA circolare a polarità negativa di circa 3,8 kb. TTV è inoltre caratterizzato da un'elevata variabilità genetica e produce una viremia persistente in circa 80% degli individui nella popolazione generale.

Sebbene siano stati svolti numerosi studi per comprendere il ruolo patogenetico del virus, attualmente non siamo in grado di associare TTV ad una specifica patologia. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di comprendere uno specifico aspetto dei rapporti che il virus instaura con il sistema immunitario dell'ospite.

In accordo con studi condotti da Lunderberg e collaboratori (2003) è stato calcolato l'indice CpG su genomi completi appartenenti agli anellovirus presenti in banca dati. Tale indice permette di comparare il potenziale immunostimolatorio di differenti virus indipendentemente dalla loro lunghezza

genomica, dal contenuto nucleotidico e dalla soppressione del dinucleotide CpG. I risultati hanno mostrato valori dell'indice molto diversi sia tra i differenti anellovirus che tra i genogruppi e genotipi di TTV. In particolare, nell'ambito dei genogruppi di TTV, gli isolati classificati all'interno del gruppo 4 hanno mostrato valore medio dell'indice CpG più alto in assoluto suggerendo che tali isolati potrebbero avere un potenziale immunostimolatorio più marcato.

Per valutare tale ipotesi è stato messo a punto un sistema *in vitro* costituito da cellule di milza di topo che ha permesso di determinare il potenziale immunostimolatorio di un isolato virale di genogruppo 4 denominato ViPiSal.

I risultati hanno mostrato che tali cellule in seguito al trattamento con l'isolato ViPiSal in combinazione con lipofectina e/o ODN 1826 producevano aumentati livelli nell'espressione genica di alcune citochine pro-infiammatorie, come IFN- γ e IL-6. Questi risultati suggeriscono che TTV (o almeno alcune delle numerose varianti genetiche del virus) potrebbero avere un ruolo nella patogenesi di malattie infiammatorie croniche.

Abstract

TorqueTeno virus (TTV) is the prototype of a vast array of viral agents with similar genomes that continue to be discovered in humans and animals and that are presently classified in the newly established, free-standing genus *Anellovirus*. These viruses are small, unenveloped and possess a circular, negative-strand DNA genome of about 3.8 kb. TTV is genetically highly divergent and produces long-lasting, possibly life-long viremia in approximately 80% of apparently healthy individuals of all ages. Although several attempts have been made to link TTV to the etiology of a specific disease, a direct role of the virus in pathogenesis has not yet been established.

The aim of the study has been to investigate a specific aspect of the relationships between TTV infection and the host's immune system. To this purpose, according to a previous study by Lundergerg and co-workers (2003), the CpG index was calculated for each anelloviral genome and this was used to compare the immunomodulatory potential of the different viruses regardless of genome size, nucleotide content, and overall CpG suppression. The results showed that the values of the CpG index varied extensively among the anelloviruses and were also different among the different genogroups and genotypes of TTV. In particular, viral isolates classified within

the TTV group 4 revealed the highest CpG index values, thus suggesting that this genogroup might have a greater immunomodulatory potential than the other TTV genogroups.

Based on these findings, we evaluated the *in vitro* immunostimulatory potential of a specific group 4 TTV DNA, termed ViPiSal. Spleen mouse cells treated with this DNA alone or in combination with synthetic oligodeoxyribonucleotides (ODNs) showed an enhanced expression of the genes for specific cytokines, including gamma interferon (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6). This latter finding demonstrates that TTV group 4 DNA may have immunostimulatory effects, driving the immune system towards Th-1 responses and suggesting that TTV (or at least some of the many genetic variants of the virus) might play a role in the genesis of chronic inflammatory diseases.

Anellovirus

Cenni storici

Durante questi ultimi decenni, in cui si è assistito ad un progressivo miglioramento delle tecniche di indagine diagnostica e di biologia molecolare, è stato possibile caratterizzare dal punto di vista eziologico la maggior parte delle epatopatie fino ad allora di origine sconosciuta. Tuttavia, ancora oggi, permane un buon numero di pazienti affetti da patologia epatica criptogenetica. Ciò ha stimolato molte ricerche, condotte al fine di determinare la possibile esistenza di nuovi agenti patogeni implicati nel danno epatico. Uno di questi studi risale al 1997, data in cui Nishizawa e collaboratori (Nishizawa et al., 1997) identificarono nel siero di un paziente con epatite post-trasfusionale non-A non-G una sequenza di 500 nucleotidi, che ben presto fu riconosciuta appartenere ad un nuovo agente virale: dalle iniziali del paziente il virus fu chiamato TT (TTV). La tecnica che ha reso possibile l'identificazione del nuovo virus è chiamata *analisi di rappresentazione differenziale* (RDA): tale tecnica, sviluppata da Lisitsyn nel 1993 (Lisitsyn e Wigler, 1993), consente di evidenziare sequenze di DNA selettivamente espresse nei

tessuti patologici quando confrontate con sequenze derivanti dai tessuti sani degli stessi soggetti. Nel caso specifico di TTV il materiale genetico fu estratto al momento in cui il paziente presentava un picco nei livelli di transaminasi (ALT), e successivamente confrontato con il DNA del medesimo individuo quando i livelli di ALT risultavano normali (Figura 1). Le sequenze esclusive del picco furono in seguito analizzate e paragonate con quelle disponibili in banca dati. In questo modo si approdò all'isolamento di un clone di 500 nucleotidi, denominato N22, che non presentava alcuna omologia con le sequenze fino ad allora note, e che per questo fu considerato il prototipo di un nuovo virus a DNA monocatenario lineare. Studi condotti dal gruppo di ricerca di Okamoto (Okamoto et al., 1998b) portarono alla caratterizzazione di un genoma virale, apparentemente completo, di 3,739 kilobasi (kb) denominato TA278. In realtà era stato sequenziato il 90% dell'intero genoma. Le ridotte dimensioni del virione, l'assenza di *envelope* ed alcune caratteristiche della sequenza nucleotidica indussero ad inserire provvisoriamente il virus nella famiglia *Parvoviridae*. Nel 1999 Miyata e collaboratori, non riscontrando nell'isolato TA278 la presenza delle strutture palindromiche terminali tipiche dei parvovirus, svolsero ulteriori studi grazie ai quali identificarono una nuova regione

ricca in guanine e citosine (GC) di circa 100 nucleotidi: il genoma di TTV non era quindi lineare ma le due estremità del DNA risultavano connesse covalentemente da tale regione ricca in GC. La scoperta della natura circolare del virus, insieme ad alcune proprietà strutturali e molecolari che quest'ultimo mostrava condividere con i membri della famiglia *Circoviridae* ed in particolare con il virus dell'anemia del pollo (CAV), alimentarono la convinzione che TTV rappresentasse il primo circovirus dell'uomo (Miyata et al., 1999). La famiglia *Circoviridae* comprende infatti agenti patogeni molto diffusi negli animali ma nessun altro virus dell'uomo. In seguito sono state isolate numerose specie virali strutturalmente affini a TTV, tra cui gli isolati PMV (Hallett et al., 2000), SANBAN (Hijikata et al., 1999) e YONBAN (Takahashi et al., 2000a); questi ceppi virali presentano divergenze nucleotidiche, rispetto al prototipo TA278, superiori al 50%. TTV comprende quindi un insieme molto complesso di specie virali altamente eterogenee dal punto di vista genetico. Il quadro divenne ancora più complicato con la scoperta di un altro gruppo di virus con proprietà intermedie tra quelle di TTV e di CAV (Takahashi et al., 2000b); il capostipite del nuovo gruppo venne denominato TLMV (TTV-Like-Mini-Virus), a sottolineare le dimensioni più

piccole del genoma che risultava 2,9 kb, contro le 3,8 kb tipiche dei TTV.

Negli anni trascorsi dalla scoperta del virus, molti studi sono stati effettuati per definire le sue proprietà molecolari e per determinarne il reale potenziale patogeno. I primi studi, visto l'iniziale isolamento di TTV in un paziente con epatite criptogenetica, furono volti principalmente al cercare di stabilire se il virus potesse avere un ruolo nel causare malattie del fegato. La presenza del nuovo agente virale, in base alle prime osservazioni, sembrava effettivamente correlare con lo sviluppo di tali malattie. Lavori successivi, sebbene i dati forniti siano spesso contrastanti, hanno portato invece ad escludere un coinvolgimento del virus come agente primario di patologie epatiche. Il ruolo eziologico di TTV è stato inoltre indagato in malattie diverse da quella epatica senza tuttavia arrivare a nessuna conclusione certa. L'elevata incidenza nella popolazione sana emersa da studi di prevalenza ha spinto anzi alcuni autori a proporre TTV come un commensale dell'uomo assolutamente apatogeno (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000). Finché non si saranno fatte indagini più complete è però più corretto considerarlo un virus "orfano", in attesa di essere associato ad eventuali patologie che possono magari svilupparsi in una minima percentuale dei soggetti infettati.

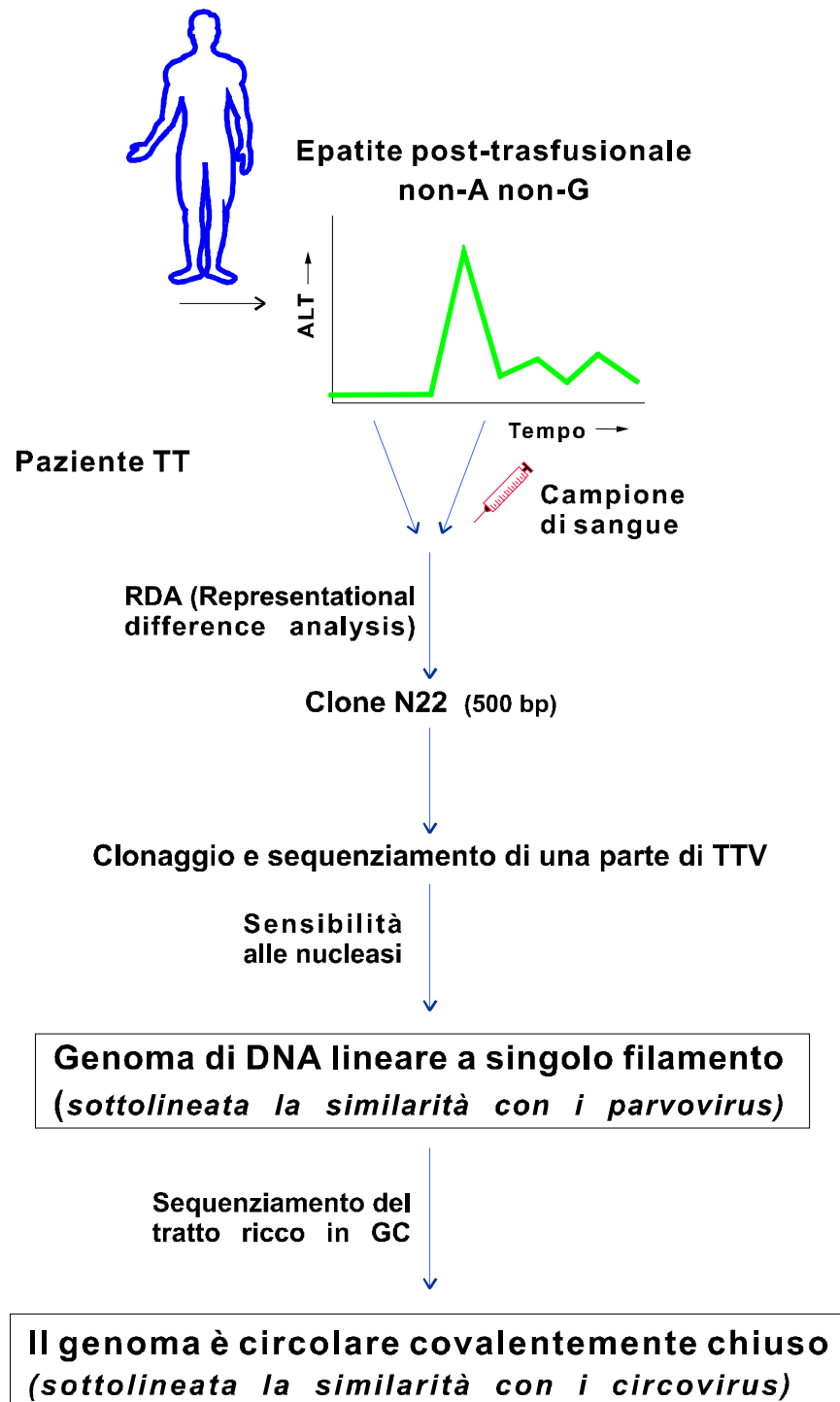


Fig.1: Metodiche utilizzate per la scoperta e la caratterizzazione del virus (tratta e modificata da Bendinelli et al., 2001).

Tassonomia e nomenclatura

La classificazione di TTV ha subito nel corso degli anni numerose modifiche, ed ancora oggi l'inquadramento tassonomico del virus rimane incerto. TTV è stato associato inizialmente alla famiglia *Parvoviridae* poiché privo di involucro lipidico esterno e costituito da un genoma a DNA a singolo filamento (Okamoto et al., 1998b). La successiva scoperta della regione ricca in GC (Miyata et al., 1999) ed altre caratteristiche strutturali e molecolari di TTV, hanno condotto Hijikata e collaboratori (Hijikata et al., 1999) a sostenere la possibile appartenenza del virus alla famiglia *Circoviridae*. Questi ultimi sono infatti privi di pericapside, possiedono un DNA monocatenario circolare e presentano un capsido icosaedrico probabilmente composto da un'unica proteina strutturale (Todd et al., 1990). I circovirus animali noti sono tre: il circovirus porcino (PCV), il virus della malattia del becco e delle penne dei pappagalli (BFDV), ed il virus dell'anemia del pollo (CAV). Successivi studi hanno tuttavia messo in luce notevoli differenze, in particolare a livello della sequenza nucleotidica, tra i circovirus animali e TTV, sebbene CAV sembri avvicinarsi maggiormente a quest'ultimo. Sia CAV che TTV posseggono un genoma circolare a singolo filamento di polarità negativa, con dimensioni rispettivamente di 3231 e 9853 nucleotidi. Inoltre

presentano entrambi una regione genomica codificante ORF suddivisa in frammenti sovrapposti (Iwata et al., 1998), ed una regione non tradotta UTR ricca in GC con notevole omologia tra i due virus (Miyata et al., 1999). Sebbene TTV condivide alcune caratteristiche con CAV, molte delle sue peculiarità rimangono al momento uniche, tanto che Mushahwar e collaboratori hanno proposto di considerare il virus come il solo rappresentante di una nuova famiglia per la quale è stato indicato il nome *Circinoviridae* (Mushahwar et al., 1999). In seguito alla scoperta del TT-like mini virus (TLMV), virus con caratteristiche intermedie tra TTV e CAV, è stata avanzata un'altra proposta che suggeriva di classificare i tre virus in una nuova famiglia detta *Paracircoviridae* (Takahashi et al., 2000b). Di recente, nell'attesa di stabilire definitivamente una classificazione, è stato istituito dal Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus (CITV) un gruppo di studio, il quale ha proposto di inserire TTV e TLMV in un nuovo genere detto *Anellovirus* (dal latino "anello"). E' stato inoltre proposto di cambiare il significato degli acronimi di TTV e TMLV: TorqueTeno Virus (dal latino "catena sottile") per TTV e TorqueTeno Mini Virus (TTMV) per TLMV (Hino, 2002; Todd et al., 2002). Ambedue le proposte sono state accettate.

Nel genere *Anellovirus* sono stati inseriti tutti i ceppi di TTV e TTMV accomunati da simili caratteristiche ma dotati di differenti gradi di divergenza genetica.

Tuttavia, il numero di virus simili a TTV sembra essere destinato a crescere. Infatti Jones e collaboratori hanno identificato nel plasma di due pazienti con sindromi d'infezione acuta ad eziologia sconosciuta, due nuove sequenze virali. Dal confronto in banca dati è emersa una somiglianza con i virus del gruppo TT seppur con divergenze genetiche elevate. Le nuove sequenze virali sono risultate avere dimensioni rispettivamente di 2.249 nt e di 2.635 nt, collocandosi perciò tra TTV e TTMV. I due nuovi virus sono stati, quindi, classificati nel genere *Anellovirus* in quanto possiedono un genoma circolare a singolo filamento con polarità negativa e presentano, come TTV e TTMV, una regione genomica codificante suddivisa in più ORF parzialmente sovrapposte e una regione non tradotta UTR. I nomi assegnati a tali virus sono Small Anellovirus 1 (SAV1) e Small Anellovirus 2 (SAV2). I due SAV mostrano tra loro un'omologia del 54% e con TTV e TTMV rispettivamente del 32% e 35%. A causa delle loro dimensioni, della loro organizzazione genomica e della distanza filogenetica dagli altri anellovirus, è stato proposto che SAV1 e

SAV2 rappresentino un terzo distinto gruppo di Anellovirus (Jones et al., 2005).

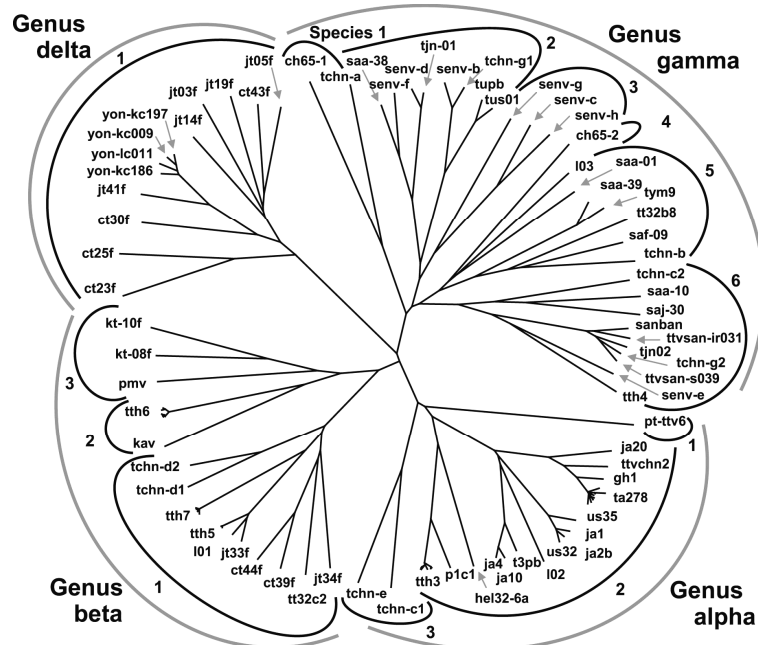
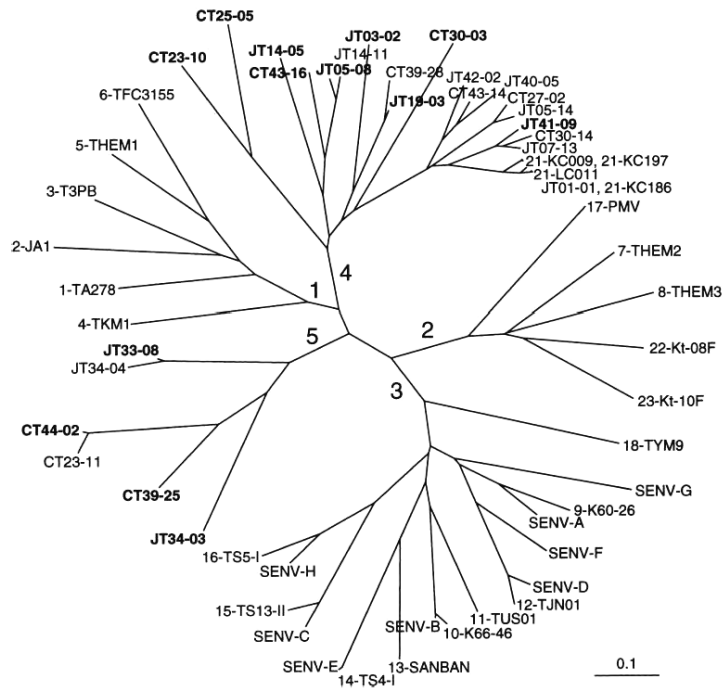
Recentemente, Ninomiya e collaboratori hanno identificato nel plasma di pazienti affetti da emofilia tre nuove sequenze virali denominate MD1-032, MD1-073 e MD2-013 che hanno mostrato una identità genomica con i due isolati SAV tra il 76% e il 99%. I tre isolati completi hanno tra di loro un'omologia compresa tra il 90% e il 72%, segregano nello stesso cluster e sono filogeneticamente distinti da tutti gli isolati di TTV e TTMV. Questi risultati hanno suggerito che gli isolati SAV possano essere mutanti deleti di un nuovo virus con lunghezza intermedia tra TTV e TTMV chiamato TTMDV e che potrebbe essere classificato in un altro gruppo del genere *Anellovirus*. (Ninomiya et al., 2007).

I primi studi sulle relazioni filogenetiche degli isolati di TTV sono stati condotti scegliendo come bersaglio per l'amplificazione la regione N22 dell'ORF1: tali analisi hanno permesso l'identificazione di 23 genotipi che sono stati inizialmente riuniti in quattro principali gruppi filogenetici (Okamoto et al., 1999; Biagini et al., 1999). Tuttavia la breve regione N22 si è in seguito rivelata poco adatta per studiare queste relazioni e rilevare l'intera varietà di specie dei TTV esistenti. Successivi studi, condotti sulla regione non tradotta

(*Untranslated Region*, UTR) e sull'intero genoma, hanno infatti portato all'identificazione di più di 40 genotipi e 70 sottotipi. Peng e collaboratori, nel 2002, proposero una nuova classificazione per la quale gli isolati fino al momento identificati (72) venivano raggruppati in 5 principali genogruppi, identificati con i numeri da 1 a 5, sulla base di divergenze nucleotidiche almeno del 50% (Peng et al., 2002; Figura.2A). Il criterio di classificazione prevedeva inoltre la distinzione in genotipi, contraddistinti da numeri arabi, con divergenze nucleotidiche maggiori del 30% e in sottotipi, identificati da lettere minuscole, per isolati con divergenza compresa tra il 15% e il 29%. Il ceppo prototipo TA278, secondo questa classificazione, è stato inserito insieme ai genotipi dal 2 al 6 nel genogruppo 1. Il genogruppo 2 comprende gli isolati di TTV di genotipo 7, 8, 22, 23 e 17; quest'ultimo è l'isolato prototipo PMV (Hallett et al., 2000). Il genogruppo 3, la cui classificazione risulta particolarmente complessa per la numerosità di isolati che comprende, è composto dai genotipi dal 9 al 16 (l'isolato prototipo è il SANBAN), dai genotipi 18, 19 (SENV-F) e 20 (SENV-G) e da altri sette genotipi di SENV, da A ad H. L'isolato YONBAN, genotipo 21 di TTV, è il prototipo del genogruppo 4, che include in totale 9 genotipi, mentre altri 4, rappresentati dall'isolato JT33 sono

stati classificati nel genogruppo 5 (Peng et al., 2002). Per quanto riguarda TTMV, che pure presenta un grado notevolmente alto di eterogeneità genetica, forse addirittura superiore a quella mostrata da TTV, attualmente risulta distinto in 4 genogruppi, separati da distanze genetiche superiori al 40% (Biagini et al., 2001b; Gallian et al., 2002).

Recentemente, sulla base di un'analisi filogenetica nella quale sono state confrontate le sequenze di 24 nuovi isolati con quelle di 79 isolati già presenti in banca dati, Jelcic e collaboratori hanno proposto di inserire i ceppi di TTV in una nuova famiglia denominata *Anelloviridae* (Jelcic et al., 2004). Il CITV per il momento non si è pronunciato su tale proposta. Il genogruppo 1, secondo questa classificazione, verrebbe trasformato nel genere α e i genogruppi 3 e 4 rispettivamente nei generi γ e δ , mentre i genogruppi 2 e 5 sarebbero raggruppati nel genere β . In base a questo nuovo criterio, la specie viene definita come un gruppo di tipi di TTV che mostrano tra loro un'identità di sequenza superiore al 60%. Si parla invece di tipi e sottotipi virali se l'identità di sequenza supera rispettivamente il 90% e 96%; infine gli isolati che presentano tra loro omologie superiori al 96% vengono definiti come varianti di uno stesso sottotipo (Figura .2B; Jelcic et al., 2004).



La particella virale

Il genotipo 1 di TTV è stato senza dubbio quello maggiormente studiato in letteratura e di conseguenza le informazioni circa le proprietà chimico-fisiche e le caratteristiche morfologiche del virus sono riferite principalmente a questo tipo. Tuttavia, le attuali conoscenze porterebbero ad escludere differenze morfologiche significative tra i vari genotipi del virus. Sfortunatamente non è stato ancora trovato un sistema di coltura cellulare in vitro capace di permettere la replicazione di TTV, per cui le informazioni sulle caratteristiche strutturali del virus derivano, per la maggior parte, da studi condotti con particelle virali purificate da plasma o da feci. L'incubazione di sovrinatante fecale contenente il genotipo 1a di TTV con γ -globuline purificate da plasma umano contenente anticorpi specifici per il medesimo genotipo ha permesso la visualizzazione di TTV al microscopio elettronico (Figura 3; Itoh et al., 2000): il virus è apparso di forma sferica con capsidi a probabile simmetria icosaedrica e privo di pericapside. Il diametro del virus, già precedentemente determinato mediante l'uso di filtri con pori a dimensioni decrescenti (Mushahwar et al., 1999), è risultato compreso tra 30 e 32 nm. E' stato inoltre dimostrato che il virus è resistente al trattamento con detergenti come il Tween 80 (Okamoto et al., 1998a), ai solventi

e al calore secco (62°C per 96 h), a conferma del fatto che TTV non è rivestito da involucro esterno. L'assenza di un involucro lipidico esterno è ulteriormente confermata dal ritrovamento di TTV nella bile di soggetti infetti (Ukita et al., 1999), dove, per la presenza di acidi biliari, si possono rilevare solo virus privi di envelope. Gli esperimenti condotti nel tentativo di ridurre l'infettività del virus hanno messo in luce la grande stabilità e resistenza di quest'ultimo a molti trattamenti, resistenza paragonabile a quella mostrata dai parvovirus e circovirus. L'eliminazione di TTV è stata ottenuta tramite purificazione per immunoaffinità o con trattamenti al calore particolarmente drastici (Simmonds et al., 1998; Takayama et al., 1999a; Yokozaki et al., 1999b). Alcuni lavori riportano l'esistenza nel sangue di particelle virali complessate ad immunoglobuline (Ithoh et al., 2000); per il resto non si conoscono altre forme circolanti del virione. Le proteine di TTV non sono state ancora ben caratterizzate; tuttavia, per analogia con CAV, si ritiene che il capsido sia costituito da un'unica proteina strutturale. Al momento non sono stati identificati né carboidrati né lipidi virali.

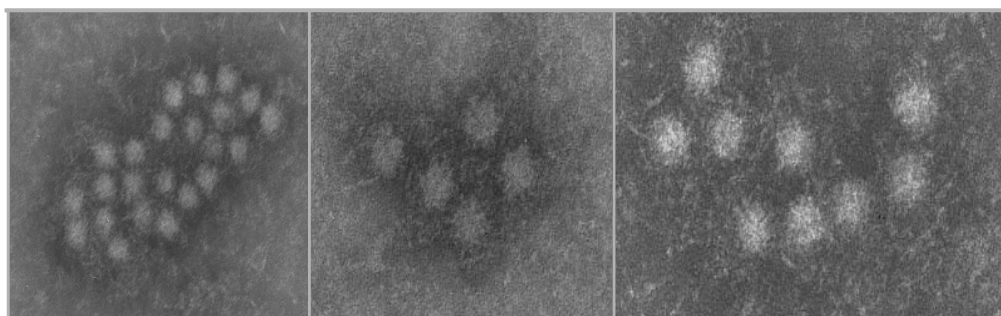


Fig. 3. Visualizzazione al microscopio elettronico di particelle di TTV, in forma di aggregati in seguito ad incubazione con γ -globuline umane specifiche per il genotipo 1a (Itoh et al., 2000).

Genoma e proteine codificate

Le prime informazioni che hanno permesso la caratterizzazione del genoma di TTV sono state ottenute sottoponendo l'acido nucleico all'azione di diversi enzimi: la resistenza alla Rnasi A e la sensibilità alla Dnasi I ed alla nucleasi Mung-bean ne hanno dimostrato la natura a singolo filamento di DNA (Okamoto et al., 1998b; Mushahwar et al., 1999). Attraverso esperimenti di ibridazione con molecole di RNA a polarità positiva e successiva digestione, è stato possibile dimostrare che il DNA virale possiede una polarità negativa (Mushahwar et al., 1999). Ulteriori informazioni sulla struttura del genoma derivano dall'analisi delle sequenze. Come già detto il sequenziamento del 90% del genoma aveva inizialmente fatto ritenere che il DNA del virus fosse lineare (Okamoto et al., 1998b) ma ciò è stato smentito con la successiva identificazione di una regione di circa 100 nucleotidi ricca in GC (Miyata et al., 1999): il genoma di TTV è dunque costituito da un singolo filamento di DNA circolare chiuso covalentemente da tale regione. L'amplificazione completa dell'acido nucleico (circa 3,8 kb), è stata realizzata mediante PCR inversa condotta a partire dalla regione N22 (Mushahwar et al., 1999). Analizzando tutte le sequenze di TTV e TTMV al momento note, è emersa una notevole somiglianza tra i due gruppi di virus

nell'organizzazione genomica; l'unica sostanziale differenza si è riscontrata nell'ampiezza della loro sequenza nucleotidica che differisce di circa 1 kb (il genoma di TTMV è 2,9 kb). Le differenze nelle dimensioni del genoma fra i virus del gruppo TTV sono risultate invece più modeste (Kamahora et al., 2000; Okamoto et al., 2000a; Muljono et al., 2001). Le informazioni sulla organizzazione del genoma di TTV e sulle proteine codificanti, non ancora ben caratterizzate, derivano principalmente dal sequenziamento dei diversi isolati; molto importante si è rivelato anche il confronto delle sequenze del gruppo TTV, con quelle dei virus meglio caratterizzati della famiglia *Circoviridae*.

Il genoma è costituito per due terzi (2,6 kb) da una regione codificante ORF e per un terzo da una regione UTR non tradotta ma ricca di elementi regolatori (Kamada et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Figura 4). La regione espressa comprende, sul filamento complementare al genoma, da due a sei ORF, potenzialmente codificanti con schemi di lettura differenti e parzialmente sovrapposte. Il gene ORF1 di TTV, localizzato tra i nucleotidi 589 e 2898 sul ceppo TA278, codifica per un prodotto proteico di circa 770 aminoacidi (675 in TTMV), che è ritenuto l'equivalente della proteina capsidica di CAV denominata VP1. La proteina tradotta dall'ORF1 di TTV oltre a

svolgere probabili funzioni strutturali, potrebbe essere coinvolta nel meccanismo replicativo: essa presenta, infatti, un tratto di circa 100 aminoacidi molto ricco in arginina il quale, per la sua natura idrofilica, potrebbe avere un ruolo nel mediare l'interazione con il DNA (Shoya et al., 1998; Vihinen-Ranta et al., 1997); tale dominio si ritrova anche nella regione aminoterminale di VP1 di CAV (Okamoto et al., 1998b).

Sono stati inoltre individuati, all'estremità C-terminale del gene ORF-1, due motivi aminoacidici tipici delle replicasi Rep, che risultano molto conservati tra i circovirus animali e vegetali e che vengono utilizzati dai virus a DNA che si replicano mediante il meccanismo a cerchio rotante. Inoltre, l'identificazione nella ORF-1 di potenziali siti di glicosilazione e di tre regioni ipervariabili (*High Variable Regions*, HVR 1, 2 e 3), suggerisce possibili ulteriori funzioni della putativa proteina nell'interazione con l'ospite. Le 3 regioni HVR e i siti di glicosilazione, estremamente variabili nel numero e nella localizzazione tra i diversi isolati di TTV, potrebbero infatti modificare le proprietà biologiche ed antigeniche della proteina stessa (Hijikata et al., 1999).

Il gene ORF-2, compreso tra i nucleotidi 353 e 712 di TA278, sembra codificare per una proteina strutturale di circa 120 aminoacidi in TTV (100 in TTMV), probabilmente coinvolta

anche nella replicazione virale. A conferma di ciò, sono state di recente identificate 5 omologie di sequenza fra questa proteina, (precisamente quella codificata dall'isolato SANBAN), e la proteina VP-2 di CAV; quest'ultima ha una doppia funzione enzimatica, tirosin e serina/treonina fosfatasi ed è implicata, durante la replicazione del virus, nei meccanismi di trasmissione intracellulare dei segnali (Peters et al., 2002). Il gene ORF-2, dall'analisi della sequenza di molti isolati di TTV, risulta spesso contenente altre due piccole ORF molto conservate, denominate a e b, le cui capacità codificanti non sono ancora ben note (Tanaka et al., 2000b; Kakkola et al., 2002).

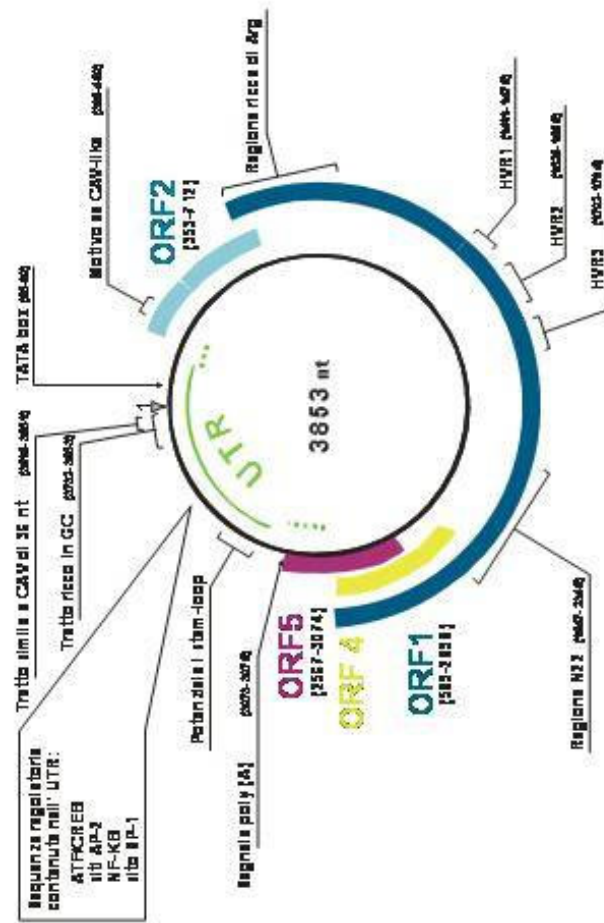


Fig 4: . Organizzazione genomica di TTV. È mostrato il DNA a polarità negativa come presente nel virione. Le posizioni si riferiscono all'isolato TA278.

Esperimenti in cui sono state trasfettate cellule COS1 con un vettore contenente un costrutto del genoma linearizzato di TTV (genotipo 1) hanno dimostrato la presenza di altre ORF e condotto all'identificazione di tre distinti mRNA di 3,0, 1,2, e 1,0 kb (Kamahora et al. 2000); i tre mRNA, che presentano polarità antigenomica ed hanno il sito di poliadenilazione al 3' e il sito cap al 5', sono stati ritrovati anche in cellule di midollo osseo infettate da TTV (Okamoto et al., 2000d; 2001). Analizzando i possibili siti di *splicing* utilizzati per produrre questi mRNA, sono state individuate su cornici di lettura differenti altre 2 ORF minori, dette ORF-4 e ORF-5. Il messaggero più lungo conterrebbe per intero il gene ORF-1, mentre i due mRNA più corti risulterebbero dalla combinazione dell'ORF-2 con l'ORF-4 e l'ORF-5 (Figura 5). I prodotti proteici derivanti dalla ORF-3 (o ORF2-4) e dalla ORF 2-5 potrebbero essere coinvolti nel controllo della replicazione e trascrizione virale. In particolare l'ORF3 codifica potenzialmente per due proteine dotate di un differente grado di fosforilazione e per questo simili alla proteina NS5A del virus dell'epatite C (HCV; Asabe et al., 2001). Inoltre il gene ORF3, in base a studi condotti da Kooistra e collaboratori, sembra codificare anche per una proteina di 105 aa la quale sarebbe capace di indurre apoptosi in linee cellulari derivanti da carcinoma epatocellulare

umano ma non in quelle derivate da altre forme tumorali (Kooistra et al., 2004). Dalla sequenza nucleotidica di alcuni isolati di TTV possono essere dedotte altre ORF, ma il loro significato funzionale rimane al momento sconosciuto (Yokoyama et al., 2002). Studi recenti di trasfezione, in cui sono stati inseriti costrutti del genotipo 6 in cellule umane immortalizzate provenienti da rene (cellule 293), hanno evidenziato, mediante *Western blotting*, l'espressione di almeno 6 proteine, generate con differenti strategie di traduzione a partire da 2 diversi codoni d'inizio, O1AUG (nt 581) e O2AUG (nt 354), di 3 distinti mRNA. Questi ultimi, ottenuti con splicing alternativi, mostravano dimensioni pressoché identiche (2,8, 1,2, e 1,0 kb) agli mRNA precedentemente identificati *in vitro* nelle cellule COS1 e nel midollo osseo. E' stato inoltre possibile, utilizzando adeguati sistemi di marcatura, stabilire la localizzazione sub-cellulare delle 6 proteine: sono stati osservati tre *patterns* di espressione secondo cui due proteine (ORF1 ed ORF2) risultavano avere una localizzazione principalmente citoplasmatica, due proteine (ORF2/2 ed ORF 2/3) erano localizzate esclusivamente nel nucleo, mentre altre due (ORF1/1 ed ORF1/2) erano distribuite tra citoplasma e nucleo. Le proteine ORF1 ed ORF2, in base a questo studio, sarebbero tradotte dall'mRNA di 2,8 kb a partire, rispettivamente, dalle

triplette d'inizio O1AUG e O2AUG; le proteine ORF2/2 ed ORF2/3 deriverebbero invece dallo splicing degli mRNA rispettivamente di 1,2, e 1,0 kb partendo da O2AUG; anche ORF1/1 ed ORF1/2 risultano derivare dagli stessi RNA messaggeri di 1,2, e 1,0 kb ma utilizzando come codone d'inizio traduzione O1AUG (Qiu et al., 2005).

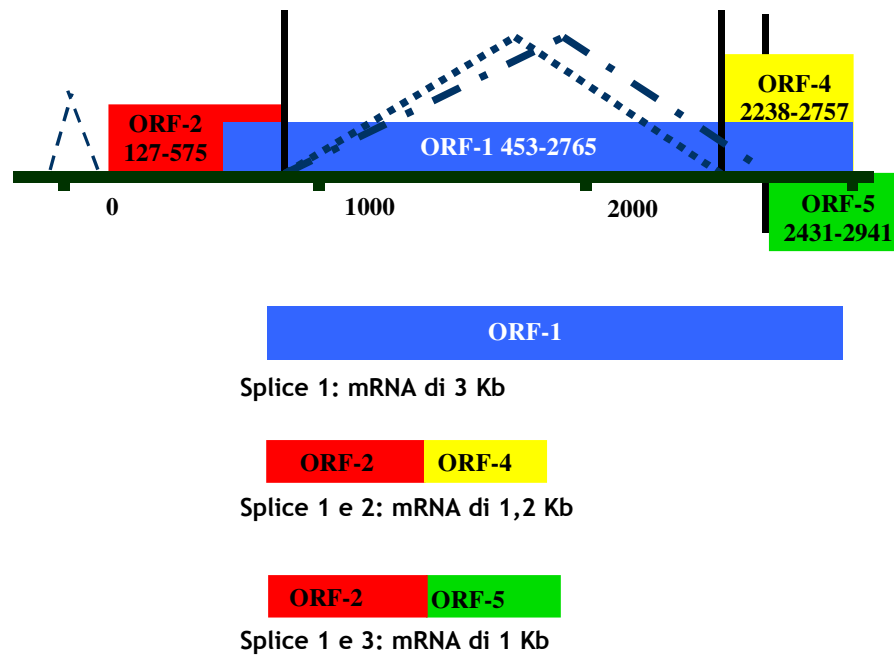


Fig. 5: In A schema del trascritto primario con indicate le regioni codificanti e i tre possibili splicing. In B schema dei tre trascritti secondari ottenuti dopo lo splicing.

La regione non codificante UTR, lunga circa 1,2 kb, comprende un tratto di nucleotidi per il 90% costituito da guanina e citosina, all'interno del quale è presente una sequenza di 36 nucleotidi che possiede un alto grado di omologia con la corrispondente regione di CAV (Miyata et al., 1999). Alcuni tratti della UTR risultano estremamente conservati tra tutti i ceppi di TTV tanto da essere utilizzati come bersaglio per lo sviluppo di metodiche di amplificazione in grado d'individuare i differenti genotipi del virus; tali regioni così conservate svolgono probabilmente funzioni di estrema importanza per la vitalità del virus. A questo proposito è stato dimostrato che in tutta la regione UTR, e in particolar modo nel tratto ricco in GC, si possono formare complesse strutture secondarie caratterizzate dai tipici motivi ad ansa notoriamente associati a funzioni regolatorie (Hijikata et al., 1999; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999). Anche alcuni tratti della regione UTR di CAV sembrano rivestire un importante ruolo regolatorio nella trascrizione e replicazione virale: mediante saggi di espressione *in vitro* (Noteborn et al., 1994), sono state identificate, oltre ai siti di poliadenilazione a valle di VP-1 e di inizio trascrizione TATA BOX a monte di VP-2, alcune sequenze ripetute invertite che costituiscono elementi di attivazione della trascrizione, ed altre regioni di legame per specifici fattori di trascrizione in

grado di stimolare la proliferazione cellulare (SP-1, NF- κ B, AP-2). Motivi simili sono stati riscontrati anche nell'UTR di TTV. Esperimenti di mutagenesi hanno evidenziato la presenza di alcuni elementi regolatori negativi e positivi (Figura 6) con probabile attività cellulo-specifica (Suzuki et al., 2004). Recenti studi hanno inoltre identificato la localizzazione del sito di inizio trascrizione dei 3 RNA messaggeri osservati, che risulta collocarsi 113 nt a valle rispetto al promotore basale, costituito dalla *TATA box* (Kamada et al., 2004).

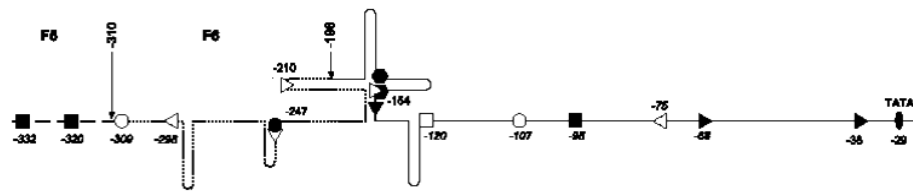


Fig. 6: Promotori ed *enhancer* di TTV in relazione alla struttura terziaria dell'UTR. Siti conservati per il legame dei fattori di trascrizione: cerchio vuoto, CREB; cerchio pieno, E2F; quadrato vuoto c-Ets, quadrato pieno, USF; esagono SP1; le posizioni sono indicate rispetto al sito di inizio trascrizione (+1 nt). Modificata da Kamada et al., 2004.

Eterogeneità genetica

A differenza della maggior parte dei virus a DNA, TTV e TTMV mostrano una straordinaria eterogeneità genetica: l'identificazione delle numerose specie virali correlate a TTV ma altamente divergenti, e la rapidità con cui ultimamente vengono isolati nuovi ceppi virali del gruppo, ne rappresentano una chiara testimonianza.

Tale variabilità genetica riguarda principalmente la regione genomica codificante di TTV, ed è massima nella zona centrale della ORF1 (si osserva soltanto il 32% di omologia fra l'isolato SANBAN e il prototipo TA278) dove sono stati identificati almeno tre segmenti ipervariabili. Queste regioni HVR di 22, 47 e 31 aa nel caso del genotipo 1, presentano molte inserzioni e delezioni, ed una diversità a livello amminoacidico tra i vari isolati che supera il 70% (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999; Takahashi et al., 1998b). In uno studio condotto nel tempo da Nishizawa e collaboratori è stato osservato che le regioni HVRs presentano un grado elevato di variabilità in soggetti con infezione cronica e che tale variabilità diventa particolarmente pronunciata durante la fase acuta dell'infezione, suggerendo un probabile coinvolgimento di queste regioni nei meccanismi con cui il virus sfuggirebbe alla risposta immunitaria. Si ritiene inoltre che le HVRs siano

implicate nella formazione della quasispecie di TTV, come del resto si verifica con l'HVR di HCV e la V3 di HIV (Nishizawa et al., 1999).

Tuttavia per tutti gli isolati di TTV non è stata riscontrata la medesima variabilità all'interno delle HVRs: infatti in un periodo di osservazione compreso tra due e otto anni le sequenze degli isolati di genotipo 12 e 13 non hanno mostrato particolari variazioni (Ukita et al., 2000).

Un meccanismo ipotizzabile per spiegare l'elevata variabilità genetica di TTV e TTMV è rappresentato dall'utilizzo preferenziale da parte di questi virus di polimerasi cellulari con scarsa capacità di "correzione di bozze" durante la replicazione. Tale ipotesi, che al momento rimane da dimostrare, è avvalorata dall'alta frequenza con cui si verificano sostituzioni nucleotidiche in certe regioni del genoma ($7,3 \times 10^{-4}$ per sito per anno nelle HVRs di SENV), paragonabile a quella osservata nei virus ad RNA e circa 10 volte maggiore di quella di virus a DNA come il virus dell'epatite B (HBV; Umemura et al., 2001b).

Sono state avanzate anche altre ipotesi secondo le quali l'alto grado di eterogeneità genetica sarebbe la conseguenza di eventi multipli di ricombinazione che si verificherebbero tra isolati diversi, o addirittura all'interno di uno stesso ceppo virale (Worobey, 2000; Biagini et al., 2001b; Manni et al., 2002). A tal

proposito sono stati identificati, sia in isolati dello stesso genotipo che in quelli di genotipo diverso, 19 siti di ricombinazione omologa di cui 13 appartenenti alla regione UTR (Worobey, 2000; Biagini et al., 2001b); questa potrebbe quindi avere un ruolo importante anche nell'amplificazione dell'eterogeneità genetica (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999). La ricombinazione, oltre che dalle caratteristiche del genoma, potrebbe essere facilitata dalla presenza di differenti isolati virali di TTV che spesso circolano contemporaneamente nel sangue o infettano il medesimo distretto corporeo dell'ospite (Worobey, 2000; Niel et al., 2000; White et al., 2000). Lo stesso può valere anche per TTMV: è stata recentemente osservata la presenza di ben 15 isolati diversi nel sangue di un soggetto immunocompromesso (Vasconcelos et al., 2002).

Tuttavia, come emerge da un recente lavoro, non vi è concordanza di opinioni circa l'ipotesi della ricombinazione come causa primaria della spiccata eterogeneità genetica di TTV e TTMV (Jelcic et al., 2004). Secondo alcuni autori, gli eventi di ricombinazione potrebbero coinvolgere, anche se con frequenza minore, virus animali correlati: sequenze filogeneticamente molto simili a TTV sono state infatti identificate in primati subumani di differente origine geografica e in altre specie animali, in particolare di allevamento quali

maiali, bovini, polli ed ovini (Leary et al., 1999; Gibbs e Weiller, 1999). Sebbene non sia attualmente noto quale importanza possa rivestire, ai fini epidemiologici, la presenza di genomi TTV-simili in questi animali, è ipotizzabile che tali ospiti mediante il passaggio interspecie possano contribuire all'evoluzione genetica del virus.

La replicazione

Le modalità adottate per la replicazione del genoma dai virus del gruppo TT rimangono al momento da chiarire; tuttavia è possibile formulare delle ipotesi soprattutto basandosi sulle analogie condivise da tali virus con alcuni membri della famiglia *Circoviridae* ed in particolare con CAV e il circovirus porcino di tipo 2 (PCV2). Nel genoma dei circovirus animali non sono state identificate sequenze codificanti per DNA polimerasi o per retrotrascrittasi; ciò suggerisce che la loro replicazione sia strettamente dipendente da enzimi di origine cellulare. Inoltre, l'assenza di sequenze capaci di alterare il ciclo della cellula ospite (Todd et al., 2001) e la capacità dei circovirus di propagarsi nelle cellule linfoidi attivate, lasciano supporre che il loro processo di replicazione dipenda dallo stato di attivazione della cellula, e in particolare da proteine prodotte durante la fase S del ciclo cellulare (Fields, 1996). Anche TTV, in base ai risultati di alcuni esperimenti, sembra necessitare per la sua replicazione di cellule in attiva divisione: è stato infatti dimostrata la capacità del virus di replicarsi attivamente in cellule del fegato, del midollo osseo (Okamoto et al., 2000d; Okamoto e Mayumi, 2001) e in cellule linfoidi stimolate (Maggi et al., 2001b; Mariscal et al., 2002); ciò induce a pensare che il processo replicativo avvenga almeno in parte nel nucleo, ma le

modalità biosintetiche e di assemblaggio del virione non sono al momento note. Inoltre, considerando l'elevata eterogeneità genetica che contraddistingue i virus del gruppo TT (Umemura et al., 2001b), è probabile che la funzione di replicasi sia svolta da polimerasi di origine cellulare con scarsa attività di "correzione di bozze". Resta ancora da chiarire anche la modalità con cui TTV viene rilasciato dalla cellula ospite. Tuttavia, data la mancanza di un involucro lipoproteico, è probabile che la liberazione dei virioni maturi avvenga per lisi cellulare.

Per la replicazione del genoma di TTV, in virtù delle somiglianze con i circovirus e in analogia ai virus vegetali e batterici con DNA monocatenario circolare, è stato proposto un meccanismo a cerchio rotante che porterebbe alla formazione di un intermedio replicativo a doppio filamento circolare. Tale ipotesi è rafforzata dall'individuazione nella ORF1 di regioni codificanti per alcuni motivi aminoacidici tipici delle proteine REP, che, come detto precedentemente, vengono utilizzate dai virus a DNA che si replicano mediante il meccanismo suddetto (Erker et al., 1999); inoltre, depone a favore di questa ipotesi anche il ritrovamento nelle cellule del fegato e del midollo osseo dell'intermedio replicativo di TTV a doppio filamento di DNA (Okamoto et al., 2000d). Ciò che invece pone dei dubbi sul reale

utilizzo da parte di TTV di tale modello replicativo è l'assenza nel genoma virale della tipica sequenza nonanucleotidica che riveste un ruolo indispensabile nella strategia *rolling-circle* (Erker et al., 1999).

E' stata inoltre indagata l'eventuale capacità di TTV di replicarsi attraverso un intermedio ad RNA (come si verifica per il virus dell'epatite B) ma, non essendo stato trovato nel suo genoma alcun motivo codificante per una retrotrascrittasi virale, si ritiene che ciò sia improbabile (Nishizawa et al., 1999).

Il genoma di TTV è stato osservato in un numero elevato di campioni biologici diversi; questo induce ad ipotizzare che il virus sia in grado di infettare un ampio spettro di tipi cellulari, probabilmente riconoscendo recettori distribuiti a livello di differenti tipi di tessuti; non è tuttavia da escludere l'uso di specifici corecettori da parte dei diversi genogruppi e/o genotipi del virus.

Interazioni con l'ospite

Le conoscenze sulla storia naturale di TTV sono scarse. Una volta acquisito, il virus appare persistere per anni nel sangue della maggior parte dei soggetti infetti (per almeno 22 anni in uno studio; Matsumoto et al., 1999) suggerendo che la cronicizzazione dell'infezione è l'evenienza più comune. Diversi lavori in letteratura hanno infatti evidenziato che più dell'80% degli individui infettati diviene portatore cronico del virus (Takayama et al., 1999b; Ali et al., 2002; Lefrère et al., 1999; Matsumoto et al., 1999). I meccanismi implicati nella persistenza sono sconosciuti; tuttavia, sembra da escludere che il virus rimanga latente nella cellula ospite in forma episomiale o integrata (Tanaka et al., 2000a; Yu et al., 2002). Quel poco che è noto riguardo all'immunità umorale non sembra prospettare un'efficace attività antivirale per gli anticorpi anti-TTV, i quali, pur prodotti durante l'infezione, non appaiono in grado, almeno nella maggior parte dei casi, né di eradicare l'infezione né di prevenire le superinfezioni; le infezioni miste con isolati eterologhi di TTV rappresentano infatti un evento molto frequente, con percentuali del 65% riscontrate in bambini al di sotto dei 7 anni, e addirittura del 90% in soggetti adulti sani (Ukita et al., 2000; Saback et al., 2002). La persistenza del virus potrebbe dunque essere facilitata

dall'incapacità del sistema immunitario dell'organismo ospite di far fronte all'infezione.

La risposta umorale si manifesta con la rapida comparsa (dopo circa 10-12 settimane dall'infezione) di IgM rivelabili nel sangue solo per 5-11 settimane, seguita da una più lenta produzione di IgG (intorno alla 15°-17° settimana) che solitamente persistono per anni (Tsuda et al., 2001). La capacità di questi anticorpi di neutralizzare il virus rimane ancora da dimostrare; dati contrastanti sono stati ottenuti soprattutto per le IgG, la cui presenza a volte è stata associata con la scomparsa o l'assenza della viremia plasmatica, mentre in altri casi non sembra aver prodotto alcun effetto sulla persistenza del virus. Studi condotti da Tsuda e collaboratori hanno infatti evidenziato come la comparsa di immunocomplessi TTV-IgG sia seguita da una diminuzione del titolo virale (Tsuda et al., 1999). Al contrario, il gruppo di lavoro di Nishizawa ha dimostrato che, in pazienti cronicamente infetti, la maggior parte di TTV circola complessato ad IgG (Nishizawa et al., 1999).

Per quanto riguarda il ruolo della risposta cellulo-mediata nel controllo dell'infezione da TTV, non si hanno al momento molte informazioni; si ritiene comunque che i linfociti T possano avere un'importante funzione sia nella persistenza che nella disseminazione virale ai vari tessuti.

Un evento precoce dell'infezione da TTV è la disseminazione del virus nel sangue, come più volte osservato in soggetti trasfusi ed anche in scimpanzé infettati sperimentalmente. La viremia, in tutti questi casi, diveniva dimostrabile dopo 5-8 settimane dall'esposizione e spesso restava evidenziabile per tutto il periodo di osservazione (Mushahwar et al., 1999; Tawara et al., 2000; Tsuda et al., 2001). I livelli plasmatici del virus nella fase cronica dell'infezione sono paragonabili a quelli di altri virus persistenti, come HCV, HBV e HIV ed oscillano fra 10^3 e 10^8 copie per ml di plasma (Pistello et al., 2001) mostrando ampie fluttuazioni nel tempo in alcuni soggetti ed una relativa stabilità in altri (Ball et al., 1999; Matsumoto et al., 1999). La cinetica del virus è stata studiata misurando gli effetti dell'interferone (IFN) sulla viremia in un gruppo di pazienti cronicamente infettati da TTV (Maggi et al., 2001c). Applicando un modello matematico simile a quello utilizzato per gli studi su HIV e HCV, è stato stimato che l'emivita di TTV nel plasma è di circa 6 ore, che ogni giorno vengono prodotti almeno 10^{10} virioni e che più del 90% del virus plasmatico subisce un turnover giornaliero (Maggi et al., 2001c; Tabella 1).

Virus	Emivita del virione	N°. minimo di virioni prodotti al giorno	Referenza
HBV	1.2 giorni	$> 1.7 \times 10^{13}$	Whalley et al. 2001
HCV	2.7 ore	$> 1.3 \times 10^{12}$	Neumann et al. 1998
HIV	< 1 ora	$> 9.8 \times 10^9$	Ramratnam et al. 1999
TTV	6.5 ore	$> 3.8 \times 10^{10}$	Maggi et al. 2001c

Tab. 1: Dinamica della viremia plasmatica di TTV confrontata con quelle di altri virus persistenti.

Anche se, come già detto, la cronicizzazione dell'infezione da TTV è l'evento più probabile, in letteratura non mancano neppure casi in cui l'infezione sembra risolversi spontaneamente, talvolta anche dopo anni o mesi dal contagio (Lefrere et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Yuki et al., 1999); una rapida eliminazione del virus è stata osservata anche in scimpanzé infettati sperimentalmente (Mushahwar et al., 1999). In realtà, la scomparsa della viremia osservata in questi casi potrebbe non significare la completa eradicazione del virus; a conferma di ciò sono state infatti isolate sequenze di TTV in diversi tessuti anche in assenza di viremia (Maggi et al., 2001c; Pollicino et al., 2002). L'apparente risoluzione dell'infezione potrebbe dipendere da una ridotta immissione in circolo del virus dovuta a fasi di latenza, da una modificazione delle sequenze virali che non permettono più la rilevazione del DNA, o semplicemente da un aumento della sua eliminazione. L'andamento dell'infezione da TTV potrebbe inoltre differire a seconda del genotipo infettante. A tal proposito, in uno studio condotto da Ohto e collaboratori è stata osservata la risoluzione spontanea dell'infezione in circa il 20% dei bambini infettati da TTV, ma con diverse percentuali a seconda del genotipo virale coinvolto nell'infezione (Ohto et al., 2002); un altro studio ha evidenziato la scomparsa della viremia nel 77% di soggetti

tossicodipendenti infettati con l'isolato SENV (Wilson et al., 2001). Tuttavia, prima di poter affermare con certezza che i genotipi di TTV possiedono una differente capacità di persistenza, è necessario che vengano svolti ulteriori studi in tale direzione.

Il genoma di TTV, come del resto quello di TTMV, è stato amplificato in numerosi fluidi biologici fra cui bile, saliva, lacrime, seme, secrezioni vaginali, fluido duodenale, liquido sinoviale e fluido cerebrospinale (Deng et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Tajiri et al., 2001; Maggi et al., 2001a; Fornai et al., 2001; Nakagawa et al., 2000; Inami et al., 2000), ad indicare la sua sorprendente disseminazione in tutto l'organismo; inoltre, il rilevamento di intermedi replicativi e di trascritti virali in molti tessuti, quali polmone, milza, pancreas, rene, linfonodi, muscolo scheletrico e tiroide; (Okamoto et al., 2001; Suzuki et al., 2001) evidenzia una probabile capacità del virus di replicarsi in molti dei tessuti che infetta (Okamoto et al., 2001) e non solo nelle cellule epatiche o in quelle del midollo osseo, come si pensava precedentemente (Okamoto et al., 1998b; Okamoto et al., 2000b; Okamoto et al., 2000d; Kikuchi et al., 2000; Lopez-Alcorocho et al., 2000; Rodriguez-Inigo et al., 2000; Comar et al., 2002). Sebbene tali risultati abbiano fornito importanti indicazioni, a causa della mancanza di sistemi di

coltivazione idonei per TTV, i tipi cellulari in grado di consentirne realmente la replicazione rimangono ancora in gran parte sconosciuti. Tuttavia, recenti studi *in vitro* hanno dimostrato che TTV è in grado d'infettare i linfo-monociti ma che la replicazione del virus avviene solamente quando questi ultimi sono opportunamente stimolati. Ciò suggerisce che la capacità di replicazione di TTV dipende dallo stato di attivazione della cellula ospite, come del resto accade per molti altri virus a DNA (Maggi et al., 2001b; Mariscal et al., 2002).

Non è stato ancora dimostrato con certezza se esista una sottopopolazione linfocitaria nella quale il virus si replichi (e/o persista) preferenzialmente, anche se alcune informazioni derivanti da studi in cui sono stati osservati quantità di virus maggiori a livello dei granulociti e dei linfociti CD19⁺, renderebbero verosimile tale possibilità (Lopez-Alcorocho et al., 2000; Takahashi et al., 2002; Yu et al., 2002; Zhong et al., 2002). Non è neppure chiaro se i diversi genotipi di TTV possano avere tropismo tissutale diverso. Tale ipotesi è in parte rafforzata dall'identificazione, in alcuni organi di un singolo soggetto, di genotipi apparentemente tessuto-specifici, in quanto diversi dalle sequenze in circolo (Okamoto et al., 2000c). Pone invece dei seri dubbi su quanto osservato il

recente ritrovamento di ben 24 isolati del virus nella milza di un paziente affetto da tumore (Jelcic et al., 2004).

Moen e collaboratori hanno infine indagato la possibilità che TTV e TTMV abbiano un ruolo come agenti immunomodulatori, similmente a quanto dimostrato per i circovirus animali. Per far luce su tale ipotesi sono stati arruolati tre gruppi di pazienti sottoposti a trattamenti immunosoppressivi diversi: i risultati hanno evidenziato cambiamenti nei titoli di TTV in base alle variazioni delle risposte di difesa fisiologiche dell'ospite (Moen et al., 2002b). In altri lavori, a conferma di quanto emerso negli studi condotti da Moen, è stata osservata una diminuzione della viremia basale in seguito a trapianti di midollo osseo o a trattamenti mielosoppressivi (Kanda et al., 1999b).

Metodi per la rilevazione diagnostica

A causa della mancanza di sistemi di coltivazione e di test sierologici, le tecniche di laboratorio utilizzate per l'identificazione di TTV e TTMV sono sostanzialmente basate su metodiche di amplificazione molecolare degli acidi nucleici. La notevole eterogeneità genetica che caratterizza tali virus ha reso critica la scelta della regione genomica da amplificare: a seconda del segmento genomico scelto può infatti variare notevolmente la sensibilità della reazione di PCR. La regione che fu inizialmente utilizzata come bersaglio dell'amplificazione è la porzione N22 del gene ORF1 (PCR N22). In seguito questo frammento, non essendo conservato fra tutti gli isolati di TTV, si è rivelato adatto soltanto per l'identificazione dei genotipi dall'1 al 6 (Muljiono et al., 2001). Le conoscenze sempre più approfondite del genoma hanno successivamente permesso di individuare un tratto dell'acido nucleico virale molto conservato tra tutti gli isolati di TTV; quest'ultimo, appartenente alla regione UTR (PCR UTR, o universale), ha permesso di amplificare con buona sensibilità tutti i genotipi conosciuti di TTV (Okamoto et Mayumi, 2001). Tale regione è divenuta il bersaglio delle amplificazioni quantitative attraverso metodiche di Real-Time PCR o PCR competitiva (Kato et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Maggi et al., 2001a; 2001c; Moen et al.,

2002a). Gli isolati virali individuati e quantificati con la Real-Time PCR universale possono essere in seguito caratterizzati con PCR genogruppo-specifiche dedotte da diverse regioni del genoma virale (Maggi et al., 2001c). Non esistono attualmente protocolli abbastanza standardizzati che permettano di discriminare i vari genotipi infettanti senza dover ricorrere al sequenziamento di tratti sufficientemente informativi del genoma virale.

Anche per quanto riguarda la diagnosi d'infezione da TTMV, tutte le metodiche al momento disponibili prevedono l'amplificazione di una porzione dell'UTR (Biagini et al., 2001a). L'utilizzo della PCR UTR ha incrementato notevolmente la percentuale di positività per TTV dei campioni precedentemente testati con metodiche di amplificazione meno sensibili, rivelando una ancor più marcata diffusione del virus: si è passati infatti dal 23 al 92% nello studio di Takahashi (Takahashi et al., 1998a), dal 9 al 50 % nello studio di Irving (Irving et al., 1999) e dal 20 al 95 % in quello di Itoh (Itoh et al., 1999b). Tuttavia, un quadro definitivo sulla reale prevalenza della diffusione di TTV si potrà avere solo con lo sviluppo di test sierologici che consentano l'identificazione di forme pregresse d'infezione. Nei pochi studi effettuati, sono stati utilizzati saggi di immunoblotting o di immunoprecipitazione combinata alla

PCR; come antigeni sono state utilizzate particelle virali intere o frammenti della proteina ORF1 o ORF2 espressi in batteri. Attraverso uno di questi saggi è stato possibile rilevare in sieri umani IgG dirette contro il virus e quantificare la percentuale di TTV immunocomplessato; inoltre, utilizzando come antigene il genoma di TTV estratto da campioni fecali, sono state rilevate anche IgM specifiche (Nishizawa et al., 1999; Tsuda et al., 1999; 2001; Handa et al., 2000; Ott et al., 2000). Tali metodiche non hanno tuttavia fornito risultati riproducibili, come mostrato dai valori di prevalenza estremamente variabili emersi nei diversi studi: dal 10% al 98% dei soggetti sani sono risultati positivi per anticorpi anti-TTV di tipo G (Handa et al., 2000; Ott et al., 2000; Tsuda et al., 2001; Kakkola et al. 2002); ciò suggerisce che il tipo di antigene adoperato è in grado di influenzare notevolmente la prestazione del saggio sierologico.

Epidemiologia

L'infezione attiva da TTV risulta ampiamente distribuita in tutte le popolazioni del mondo e la sua prevalenza, estremamente alta anche nella popolazione generale indipendentemente dall'appartenenza geografica, dall'origine etnica e dallo sviluppo socio-economico, costituisce senza dubbio l'aspetto più interessante dell'epidemiologia.

I primi studi di prevalenza, in cui era stata utilizzata la regione ORF-1 come bersaglio di amplificazione nelle reazioni di PCR, avevano segnalato una discreta diffusione del virus, il quale risultava presente in circa un terzo della popolazione analizzata, anche se con differenti percentuali a seconda dell'area geografica considerata (Niel et al., 1999). Nei paesi industrializzati, Stati Uniti e Nord Europa, la frequenza di TTV risultava molto bassa. Al contrario, nelle popolazioni africane e sud americane si evidenziarono percentuali di positività assai elevate, mentre in Asia il virus era mediamente prevalente. Furono inoltre riscontrati livelli di viremia particolarmente elevati in popolazioni isolate, ovvero limitatamente in contatto con le restanti regioni del mondo (Prescott e Simmonds, 1998). In tutti questi studi non fu rilevata alcuna associazione della prevalenza di TTV con lo status clinico dei soggetti, né con altre caratteristiche della popolazione analizzata.

La successiva introduzione della PCR universale ha rivelato una diffusione di TTV ancora più sorprendente di quanto ritenuto in precedenza; viremia plasmatica è stata, infatti, ritrovata in circa 2/3 della popolazione mondiale con variazioni, nella maggior parte dei casi, non significative fra le differenti aree geografiche (Biagini et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Matsubara et al., 2001; Niel e Lampe, 2001).

In base a questi studi la viremia è risultata particolarmente diffusa in Asia (> 90%), con picchi di prevalenza che in alcuni casi hanno raggiunto pressappoco la totalità dei soggetti esaminati. La prevalenza della viremia si è rivelata, invece, più moderata (circa 40%) in Nord America e in Oceania (Figura 7; Giappone, Arabia Saudita e Singapore).

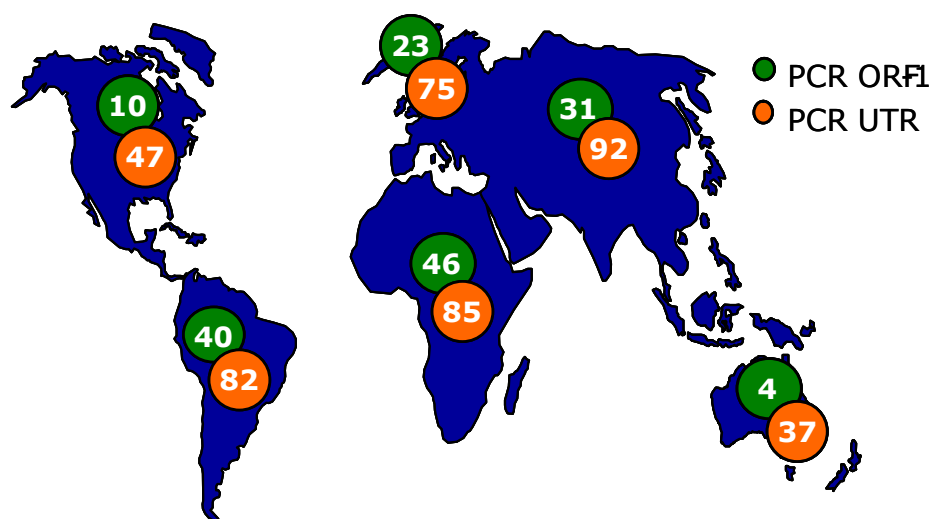


Fig. 7: Prevalenza di TTV nella popolazione. Le percentuali indicate si riferiscono ai dati ottenuti amplificando regioni dell'ORF1-1 (verde) e dell'UTR (rosso), da Bendinelli et al., 2001.

Tuttavia, è necessario precisare che l'uso della PCR permette di rilevare soltanto forme attive dell'infezione, sia acute che croniche, ma non è in grado di evidenziare forme pregresse: è quindi immaginabile che la reale diffusione complessiva del virus sia ancora più elevata di quella registrata attualmente. L'isolamento di sequenze di TTV in diversi tessuti, anche in assenza di viremia, confermerebbe tale ipotesi (Maggi et al., 2001c; Pollicino et al., 2002).

I dati disponibili per TTMV sono simili a quelli ottenuti per TTV (Biagini et al., 2000; 2001a). La distribuzione di entrambi i gruppi di virus appare non influenzata dal sesso, mentre, secondo alcuni studi, sembra che la frequenza degli individui TTV positivi aumenti con l'età (Oguchi et al., 1999; Yamada-Osaki et al., 1998): sebbene già nella prima infanzia sia stato possibile evidenziare un'ampia diffusione del virus (Davidson et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Vasconcelos et al., 2002; Maggi et al., 2003a), i livelli di prevalenza tendono ad aumentare col crescere dell'età tempo raggiungendo l'apice in quella adulta (Chen et al., 1999; Davidson et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Maggi et al., 1999).

L'elevata prevalenza della viremia di TTV e TTMV nella popolazione mondiale presuppone che tali virus possano diffondersi attraverso molteplici modalità di trasmissione. L'alta

percentuale di positività osservata in numerosi studi fra i soggetti esposti al sangue o agli emoderivati (emofilici, emodializzati, politrasfusi, talassemici, e tossicodipendenti) ha dimostrato quanto TTV e TTMV possano essere facilmente trasmessi attraverso la via parenterale. Il ritrovamento di sequenze virali in campioni di feci di soggetti viremici ha inoltre suggerito che tali virus possano essere trasmessi anche per mezzo della via orofecale. L'identificazione del genoma di TTV in neonati ha fatto supporre l'esistenza di trasmissione materno-fetale del virus, sebbene i risultati emersi dai primi studi tendessero ad escludere tale possibilità (Okamura et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Yokozaki et al., 1999a). A conferma dell'ipotesi di una via di trasmissione intrauterina, in uno studio è stata dimostrata la presenza di TTV in più del 50% dei campioni di sangue cordale esaminati; ciò suggerisce che le madri infettate dal virus possano trasmettere l'infezione al figlio attraverso la placenta (Morrica et al., 2000). Il genoma del virus è stato inoltre amplificato in campioni di latte materno: questo spiega l'esistenza di neonati TTV positivi che presentano isolati virali differenti da quelli identificati nel sangue materno (Davidson et al., 1999).

Anche la diffusione attraverso la via sessuale appare possibile vista la presenza di TTV e TTMV nel liquido spermatico, nel

fluido vaginale e nella saliva di alcuni soggetti (Gerner et al., 2000; Kazi et al., 2000; Inami et al., 2000; Liu et al., 2000; Martinez et al., 2000; Matsubara et al., 2000; Matsubara et al., 2001; Schroter et al., 2000; Stark et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Chan et al., 2001; Fornai et al., 2001; Krekulova et al., 2001; Pirovano et al., 2002a).

I risultati di un recente studio condotto su bambini di età inferiore a due anni con malattie respiratorie acute hanno indicato il tratto respiratorio come probabile sito di replicazione di TTV e proposto la via aerea come un'ulteriore modalità di trasmissione del virus. I titoli virali determinati nelle secrezioni e cellule nasali dei bambini esaminati risultavano infatti significativamente più alti se confrontati con i livelli osservati nei corrispondenti campioni di plasma e cellule monucleate del sangue (Maggi et al., 2003a). Già in precedenza, a sostegno dell'ipotesi dell'esistenza di una via di trasmissione aerea, erano state individuate sequenze di TTV a livello dell'epitelio respiratorio, nei polmoni, nelle tonsille e nelle adenoidi (Pollicino et al., 2002).

Infine, sequenze molto simili a quelle di TTV sono risultate assai frequenti in varie specie di animali di allevamento e da compagnia come cani e gatti: tali ospiti potrebbero rappresentare dei serbatoi naturali di persistenza del virus,

nonché possibili fonti di trasmissione interspecie dell'infezione (Leary et al., 1999; Okamoto et al., 2002).

Per quanto riguarda la prevalenza dei diversi genotipi di TTMV e di TTV, sono stati in realtà condotti pochi studi, i quali hanno tuttavia evidenziato una maggiore diffusione di alcuni genotipi rispetto ad altri ed un certo grado di variabilità nella loro distribuzione geografica (Gallian et al., 2000; Mikuni et al., 2002). Ad esempio, il genotipo 1 ed alcuni genotipi di SENV appaiono più diffusi in Asia anziché nei Paesi occidentali: in uno studio, il 10% dei donatori in Giappone è risultato positivo per SENV-D e SENV-H rispetto al 2-3% dei donatori positivi in USA e in Italia (Shibata et al., 2001; Umemura et al., 2001a). Differenti percentuali di prevalenza sono state osservate anche per alcuni genotipi di TTV fra paesi dello stesso continente: l'infezione con i genotipi 22 e 23 è risultata molto diffusa in Indonesia, ma praticamente assente in Giappone (Muljono et al., 2001). Rimane al momento da chiarire se i diversi genotipi vengano trasmessi con differente efficienza; a tal proposito, in un recente studio sono stati identificati genotipi di TTV appartenenti al genogruppo 2 in soggetti HIV e HBV positivi, ma non in donatori di sangue (Devalle e Niel, 2004); inoltre, da alcuni studi condotti da Pirovano e collaboratori è emersa una maggiore prevalenza di SENV-A e SENV-B in soggetti

tossicodipendenti piuttosto che in individui infettati per via sessuale (Pirovano et al., 2002b).

Associazione con la malattia

Dalla scoperta di TTV ad oggi sono stati svolti numerosissimi studi, molti dei quali hanno cercato di far luce sulla reale capacità patogenetica del nuovo virus. Sebbene i risultati di molti di tali lavori lascino aperta la possibilità che l'infezione da TTV e TTMV possa avere un qualche significato clinico, non si è ancora arrivati ad una conclusione certa che chiarisca definitivamente l'argomento (Naoumov, 2000). Inoltre, l'elevata prevalenza di TTV e TTMV nella popolazione sana, nonché la loro l'ubiquitarietà nell'ospite infettato, hanno reso ancora più difficili i tentativi di mettere in relazione tali virus con una patologia, tanto che alcuni autori si sono affrettati a ritenerli semplici commensali apatogeni dell'uomo (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000).

Poiché TTV è stato inizialmente isolato da pazienti con forme di epatite non-A non-G (Nishizawa et al., 1997), è stato proposto che il virus potesse essere la causa di malattie del fegato croniche o acute ad eziologia ancora sconosciuta. Tuttavia, studi successivi hanno sollevato seri dubbi su tale potenzialità patogenetica del virus: la presenza di TTV è stata infatti dimostrata non solo in pazienti con epatiti criptogenetiche ma anche in soggetti privi di alterazioni epatiche o addirittura senza alcuna manifestazione patologica (Berg et al., 1999;

Colombatto et al., 1999; He et al., 1999; Kanda et al., 1999a; Nakano et al., 1999; Toniutto et al., 1999; Viazov et al., 1998). Inoltre, scimpanzé naturalmente o sperimentalmente infettati con TTV o con virus correlati non hanno mostrato evidenze biochimiche od istologiche di danno epatico (Mushahwar et al., 1999; Verschoor et al., 1999). Non è stato neppure dimostrato alcun contributo di TTV nel determinare danno al fegato anche quando presente in associazione con altri agenti epatotropici come il virus dell'epatite C (HCV) ed il virus dell'epatite B (HBV; Giménez-Barcons et al., 1999; Irving et al., 1999; Lefrère et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Oguchi et al., 1999; Berg et al., 1999; Gad et al., 2000; Kao et al., 2000).

I risultati emersi da tutti questi studi hanno pertanto portato ad escludere un ruolo primario dei virus del gruppo TT nella patologia epatica (Matsumoto et al., 1999; Kao et al., 2000; Shang et al., 2000; Ali et al., 2002);

Tuttavia in letteratura sono presenti anche vari studi in cui emergono sporadiche correlazioni positive in alcuni soggetti fra viremia ed andamento delle transaminasi (Cleavinger et al., 2000; Forns et al., 1999; Fujiwara et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Itoh et al., 1999a; Jiang et al., 1999; Kanda et al., 1999b; Lefrère et al., 1999; Luo et al., 1999; Naoumov et al., 1998). Inoltre, in uno studio condotto su pazienti con epatite

fulminante, è stata osservata una mortalità del 100% in soggetti TTV positivi e del 50% in quelli negativi (Tanaka et al., 1999): non è quindi da escludere un coinvolgimento occasionale di TTV nell'aggravamento di quadri patologici a carico del fegato.

In lavori più recenti, data la presenza e la probabile capacità replicativa di TTV e TTMV in numerosi tessuti diversi da quello epatico, è stata valutata l'associazione di tali virus con altri tipi di patologia. A tal proposito è emersa un'interessante relazione tra l'infezione da TTMV e gravi patologie dell'apparato renale (Gallian et al., 2002); è stato inoltre evidenziato, in un esperimento condotto *in vitro*, un possibile ruolo di TTV nel provocare alterazioni in cellule renali simili a quelle osservate nella sindrome nefrosica (Yokoyama et al., 2002). In questo lavoro, topi transgenici per varie porzioni dell'ORF-1 mostravano segni patologici solo a livello del rene, tanto più gravi quanto maggiore era l'espressione del transgene, a conferma che il danno renale era indotto dalla proteina codificata. Ulteriore conferma giunge dallo studio condotto da Szladek e collaboratori, in cui è stata osservata la persistenza del genogruppo 1 in un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto renale (Szladek et al., 2003).

Al contrario, non è stata rilevata alcuna relazione tra TTV ed anemia aplastica, crioglobulinemia, lupus eritematoso, psoriasi (Kikuchi et al., 2000; Cacoub et al., 2003; Maggi et al., 1999) e neanche con la presenza di infezione da *Helicobacter pilori* (Toyoda et al., 2000). Deboli correlazioni sono invece emerse in pazienti affetti da diabete, fibrosi polmonare idiopatica, artrite reumatoide ed emodializzati con bassi livelli di emoglobina e scarsa risposta al trattamento con eritropoietina (Gallian et al., 1999; Bando et al., 2001; Boysen et al., 2003; Hirata et al., 1998). Inoltre, in uno studio condotto su bambini con malattie respiratorie acute di origine virale (MRA), è emerso un possibile ruolo di TTV come cofattore nella patologia di alcune affezioni delle vie aeree: in tale studio sono stati infatti osservati titoli virali più alti in pazienti con broncopolmonite (BP) rispetto ai titoli mostrati dai soggetti affetti da malattie respiratorie meno gravi (Maggi et al., 2003a).

Recentemente, tenendo conto dell'omologia che TTV mostra con alcuni circovirus animali, è stata presa in esame l'ipotesi che il virus interferisca con il sistema immunitario dell'organismo ospite modulandone l'attività (Bendinelli et al., 2001; Simmonds, 2002). A conferma di ciò, interessanti correlazioni sono emerse tra TTV e patologie del sistema linfoide: studi condotti da Shibayama e collaboratori hanno infatti evidenziato

livelli particolarmente elevati del virus in pazienti immunocompromessi (affetti da AIDS o da altre sindromi intercorrenti), suggerendo un possibile ruolo del sistema immunitario nel controllo della replicazione di TTV; i titoli di quest'ultimo aumenterebbero quindi in risposta ad un progressivo indebolimento della risposta immunitaria (Shibayama et al., 2001; Simmonds, 2002). Quanto detto è stato anche confermato dall'incremento della viremia di TTV registrato in pazienti sottoposti a trapianto epatico o a terapia con farmaci immunosoppressivi (Shang et al., 2000), oltre che da una correlazione inversa fra i livelli quantitativi del virus ed il numero di linfociti CD4⁺ in pazienti HIV positivi (Christensen et al., 2000; Shibayama et al., 2001; Touinssi et al., 2001). Tuttavia, non si è osservato un aumento dei livelli di TTV in tutti i pazienti HIV positivi; ciò induce ad ipotizzare che in seguito alla deplezione HIV-indotta dei linfociti CD4⁺, vengano prodotti, solo occasionalmente, fattori necessari per l'incremento del titolo di TTV (Moen et al., 2002a). Il reale contributo dell'infezione da TTV nella progressione dell'infezione da HIV resta comunque da chiarire.

Le somiglianze con i circovirus animali hanno inoltre suggerito l'eventualità che alcune delle complicanze ematologiche osservate in pazienti immunocompromessi, come la

neutropenia, la trombocitopenia e l'anemia possano dipendere in qualche misura dall'incremento dei livelli di TTV osservato nel midollo osseo (Kikuchi et al., 2000; Tokita et al., 2001c; Simmonds, 2002).

Una relazione tra TTV ed alterazioni del sistema immunitario è emersa anche nello studio sui bambini con MRA, in cui è stata osservata una correlazione tra i titoli del virus ed i livelli di alcune sottopopolazioni linfocitarie circolanti (in particolare con i linfociti T CD3⁺ e CD4⁺ e con i linfociti B CD19⁺; Maggi et al., 2003b).

L'elevata variabilità genetica che caratterizza i virus dei gruppi TTV e TTMV ha suggerito anche la possibilità che i diversi genotipi abbiano un differente ruolo in relazione a determinate patologie, come del resto si verifica per alcuni membri della famiglia *Circoviridae*: il circovirus porcino (PCV) ad esempio provoca una grave sindrome da deperimento con immunodepressione nel maiale, ma tale potenzialità patogenetica è attribuibile soltanto al PCV di tipo 2.

Gli studi che sono stati condotti con lo scopo di chiarire questo importante aspetto hanno fornito interessanti risultati: è infatti emersa una correlazione tra il genotipo 1a di TTV e i livelli di transaminasi in soggetti con patologie epatiche; per di più tale genotipo risultava particolarmente frequente in pazienti con

epatite fulminante o con aggravamento delle condizioni cliniche (Okamura et al., 2000; Shibata et al., 2000; Moriyama et al., 2001; Tokita et al., 2001a; 2001b; 2001c; Tokita et al., 2002). Un altro lavoro condotto da Umemura e collaboratori ha mostrato come due genotipi di SENV (SENV-D e SENV-H) fossero maggiormente presenti nel siero di pazienti con epatite post-trasfusionale non-A non-G piuttosto che in soggetti sani (Umemura et al., 2001a). Studi successivi hanno tuttavia riportato risultati contrastanti (Kao et al., 2002; Mikuni et al., 2002; Yoshida et al., 2002).

I motivi CpG nel DNA batterico e virale

Per molto tempo il DNA è stato ritenuto una componente immunologicamente inerte, ma gli studi di Tokunaga e collaboratori, nel 1984, hanno cambiato questa visione. Questi autori scoprirono che una frazione estratta dal *Micobacterium bovis*, ceppo di Calmette e Guerin (BCG), era in grado di stimolare gli immunociti di topo a produrre interferon (IFN) e di inibire la crescita di vari tumori singenici dell'uomo e del topo (Tokunaga et al., 1984). Queste iniziali osservazioni aprirono la strada ad una serie di studi volti a comprendere quale componente del BCG fosse responsabile di tali effetti. La caratterizzazione chimico-fisica della frazione del BCG, denominata MY-1, rivelò che essa era costituita principalmente da acidi nucleici e conteneva solo tracce di zuccheri e proteine. Il suo profilo di eluizione mediante HPLC (high performance liquid chromatography) era distribuito in un ampio range di pesi molecolari ma il picco di eluizione corrispondeva al peso molecolare di $2-4 \times 10^5$ kDa. La frazione MY-1 fu quindi sottoposta a digestione enzimatica con DNasi e/o con RNasi e i rispettivi prodotti purificati furono valutati per la loro attività immunologica. I risultati mostrarono che solo la frazione digerita con RNAasi manteneva la stessa capacità della frazione non digerita nel produrre IFN, mentre i prodotti purificati dopo

digestione con DNasi perdevano questa capacità. Tali esperimenti dimostrarono dunque che la molecola, presente nella frazione MY-1, in grado di indurre la stimolazione delle cellule del sistema immunitario era il DNA.

L'attività immunologica dimostrata per il DNA batterico spinse i ricercatori a indagare se tale proprietà fosse una caratteristica presente anche in altre specie. Messina e collaboratori dimostrarono che solo il DNA batterico stimolava direttamente la proliferazione in vitro di linfociti di topo, mentre la stimolazione con DNA proveniente da mammiferi non aveva effetto mitogeno (Messina et al., 1991). Questi studi stabilirono che, nonostante le notevoli somiglianze biochimiche esistenti tra il DNA dei batteri e quello dei mammiferi, le due molecole differivano per la presenza di particolari strutture che nei batteri funzionano come determinanti antigenici capaci di stimolare una risposta immunitaria o come segnali mitogeni. I motivi che mediano tale immunostimolazione furono successivamente identificati in *Escherichia coli* (E.coli) e risultarono essere dinucleotidi CpG non metilati fiancheggiati da specifiche basi (Krieg et al., 1995). Il DNA dei batteri si distingue da quello dei vertebrati sia per il contenuto in tali dinucleotidi, che per il grado della loro metilazione. Infatti nel genoma dei vertebrati i dinucleotidi CpG sono presenti solo con

una frequenza pari al 25% del valore atteso e questo fenomeno viene comunemente indicato come “soppressione dei motivi CpG” (Bird et al., 1987). Inoltre, tali motivi sono solitamente metilati sulla citosina e fiancheggiati da basi che determinano un effetto neutralizzante sul sistema immunitario piuttosto che immunostimolatorio. Al contrario il DNA batterico è caratterizzato da un’alta frequenza di motivi CpG che risultano generalmente non metilati. Queste differenze strutturali, rendono il DNA batterico capace di attivare direttamente le cellule del sistema immunitario. In particolare i motivi CpG non metilati agiscono sulle cellule presentanti l’antigene (APC), come le cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B. Tali cellule, quando attivate, producono diverse citochine immunomodulatorie come l’interleuchina (IL) 6, che contribuisce ad attivare le cellule B e T, l’interferon γ (IFN- γ), che aumenta la capacità dei macrofagi di eliminare patogeni intra ed extracellulari, ed infine l’IL-12 che regola la produzione di IFN- γ e contribuisce all’attivazione delle cellule natural killer (NK). Inoltre i motivi CpG regolano l’espressione del complesso di istocompatibilità di classe II e di molecole costimolatorie come le molecole B7-1 e B7-2 (Krieg. 1999), mentre al contrario non sembrano attivare direttamente le cellule T (Krieg. 2002). La presenza dei dinucleotidi CpG non metilati fu individuata

anche nei genomi dei virus a DNA ma a differenza del genoma batterico, in cui si ha un alto numero di tali dinucleotidi, i genomi virali mostravano differenti prevalenze in base alla loro lunghezza. Infatti si osservava una significativa riduzione del dinucleotide CpG nei genomi di lunghezza inferiore a 30 kb e un contenuto medio più alto in quelli con lunghezza superiore a 30 kb (Karlin et al., 1994). Fin dai primi studi condotti da Tokunaga era emerso che il dinucleotide CpG, per poter attivare la risposta immunitaria, dovesse essere fiancheggiato da basi specifiche (Tokunaga et al., 1992). Successivi studi condotti da Krieg e collaboratori confermarono tale ipotesi dimostrando che la massima attivazione immunitaria si osservava quando il dinucleotide CpG era preferibilmente fiancheggiato al 5' da due purine (GpA) e al 3' da due pirimidine (TpC o TpT) (Krieg et al., 1999).

L'importanza delle basi che fianleggiano il dinucleotide CpG fu ulteriormente confermata dal fatto che non tutti i motivi CpG non metilati portavano ad una immunostimolazione; infatti Krieg nel 1998 scoprì che i DNA genomici degli adenovirus di tipo 2 e 5 non avevano un effetto stimolatorio ma piuttosto immunoneutralizzante con blocco della produzione di citochine da parte del DNA batterico (Krieg et al., 1998). Altre dimostrazioni dell'esistenza di sequenze CpG neutralizzanti

derivarono dalla presenza nel DNA dei vertebrati di motivi non metilati che non inducono nessuna stimolazione del sistema immunitario. Tali motivi sono denominati neutralizzanti perché al contrario dei motivi stimolatori non solo non inducono la produzione di citochine ma antagonizzano l'effetto dei motivi stimolatori. Dal punto di vista genomico, sono caratterizzati dalla ripetizione del dinucleotide CpG preceduto da una C e/o seguito da una G (**CGGCGGGCGGCGCCGCCC**) (Krieg et al., 1998). Il potenziale immunostimolatorio caratteristico del DNA batterico e virale fa supporre che il sistema immunitario dei vertebrati abbia evoluto dei meccanismi che permettono di discriminare le differenze di struttura tra il DNA dei possibili agenti infettanti e quello dei mammiferi (Wagner et al., 1999 Krieg et al., 2002;). Il sistema immunitario potrebbe infatti aver acquisito dei meccanismi di difesa basati sul riconoscimento dei dinucleotidi CpG non metilati che potrebbero segnalare la presenza di un DNA estraneo.

Oligonucleotidi sintetici

L'azione stimolatoria del CpG DNA sulle cellule del sistema immunitario può essere mimata da oligonucleotidi sintetici (ODN) (Yamamoto et al. 1992). Infatti cellule del sistema immunitario sono direttamente o indirettamente attivate da ODN di tipo stimolatorio (ODN-S). Le cellule B sono indotte a proliferare, differenziarsi e a secernere diverse citochine immunoregatorie (Liang et al., 1996). I monociti e i macrofagi sono indotti a secernere una ampia gamma di citochine proinfiammatorie alcune delle quali attivano le cellule NK a produrre IFN- γ ed incrementano la loro attività litica verso le cellule tumorali (Chance et al., 1997). Inoltre, anche le cellule dendritiche, che sono estremamente importanti nel regolare e coordinare le risposte del sistema immunitario, sono direttamente attivate da ODN-S (Jakob et al., 1998).

Attualmente sono stati caratterizzate tre classi di ODN: la classe A o D, la classe B o K e la classe C. Gli ODN di classe A attivano preferenzialmente le cellule dendritiche e portano alla produzione di IFN- α ; dal punto di vista strutturale sono caratterizzati da un motivo palindromico CpG centrale e all'estremità 3' hanno una "coda" di guanine che ne incrementa l'attività. Sono, inoltre, caratterizzati dalla presenza di legami fosforotioati in cui uno degli atomi di ossigeno che è implicato

nel legame fosforodiestere è sostituito da un atomo di zolfo rendendo il legame resistente alle nucleasi cellulari. Gli ODN-S di classe B che stimolano preferenzialmente le cellule NK, contengono nella loro sequenza motivi CpG multipli preferenzialmente localizzati all'estremità 5' terminale ed anch'essi contengono legami fosforotioati. Infine gli ODN-S di classe C hanno caratteristiche in comune con le altre due classi. Sono, infatti, in grado di indurre l'attivazione delle cellule B o delle NK e portano alla produzione di IFN- α . A differenza degli ODN-S di classe A quelli di classe C sono interamente fosforotioati e non hanno una coda di poli guanine ma hanno sequenze palindromiche combinate con sequenze stimolatorie (Vollmer et al. 2004).

Classe di ODN-S	ODN-S di riferimento	Sequenza
A	ODN 2216	ggGGGacgaTCGTCggggggg
B	ODN 2006	tcgtcgttttgcgttttgcgtt
C	ODN M362	tcgtcgc <u>tcgttcgaac</u> gagttgat

Tab 2: Esempi delle tre classi di ODN-S. Nella sequenza è rappresentato con la lettera minuscola il legame fosforotioato, con la lettera maiuscola il legame fosfodiester; la sottolineatura indica sequenze palindromiche.

Il Recettore Toll-like 9 e la trasduzione del segnale

Il meccanismo attraverso il quale il sistema immunitario capta e risponde alla stimolazione da parte del DNA batterico e degli ODN-S è stato studiato per molto tempo. In particolare, numerose ricerche sono state compiute per capire quale recettore fosse coinvolto nella trasduzione del segnale. Liang e collaboratori, nel 1996, supposero che nei linfociti B umani l'effetto immunostimolatorio fosse mediato da un recettore cellulare di superficie che attivava la cascata stimolatoria innescata dai motivi CpG (Liang et al., 1996). Questa ipotesi si rivelò non esatta; infatti, sebbene numerosi tipi cellulari siano in grado di legare sulla loro superficie il DNA, questo legame appare non essere sequenza specifico. Studi successivi su cellule di topo dimostrarono che, affinché si osservi l'effetto immunostimolatorio, è necessaria l'entrata del DNA nella cellula: quindi, il recettore doveva essere localizzato in un compartimento intracellulare (MacFarlane et al., 1998). La localizzazione intracellulare del recettore CpG suggerì, inoltre che il riconoscimento da parte del sistema immunitario poteva essersi evoluto come meccanismo di difesa contro patogeni intracellulari. L'uptake del DNA da parte dei leucociti e/o di

altri tipi cellulari avviene all'interno dell'endosoma, dove il DNA viene acidificato e digerito dalle nucleasi. Il ruolo dell'acidificazione endosomale nella cascata di attivazione operata da ODN-S fu suggerita dal fatto che la cloroquina ed altri composti che interferiscono con l'acidificazione del compartimento endosomiale bloccano in maniera specifica l'effetto immunostimolatorio dei motivi CpG (Yi et al., 1998). Una svolta importante per comprendere quale fosse il recettore coinvolto nel riconoscimento di motivi CpG non metilati si ebbe nel 2000 quando Hemmi e collaboratori scoprirono che il recettore Toll-like 9 (TLR9) svolgeva un ruolo fondamentale nell'interazione con tali motivi. Tali autori dimostrarono che cellule del sistema immunitario provenienti da topi deficienti per i recettori TLR2 e TLR4 rispondevano al CpG-DNA con la produzione di molecole effettrici; al contrario, topi deficienti per il recettore TLR9 non mostravano nessuna risposta (Hemmi et al., 2000). Ad oggi, sono stati identificati nell'uomo 13 recettori Toll-like localizzati sia sulla superficie cellulare sia in compartimenti intracellulari, ognuno dei quali è deputato al riconoscimento di molecole associate a patogeni (PAMPs) tra cui: i mannani componenti della parete cellulare dei lieviti, i lipopolisaccaridi (LPS) caratteristici della parete dei batteri gram-negativi, le lipoproteine, i peptidoglicani e il DNA

contenente motivi CpG non metilati. Dal punto di vista strutturale, i TLR, sono proteine transmembrana di tipo I e presentano un'organizzazione comune. In particolare, nel TLR9 l'estremità amminoterminale presente nell'ectodominio è caratterizzata da un dominio ricco di leucine ed uno di cisteine; l'estremità carbossiterminale invece, localizzata nella porzione intracellulare, presenta un dominio denominato TIR (Toll/IL-1 recettore) che ha omologia strutturale con il recettore dell'IL-1 (Akira et al., 2003). Studi in cui è stata utilizzata una forma tronca del recettore indicano che 32 amminoacidi all'estremità carbossiterminale formano cinque strutture ad alfa elica che risultano critiche nella trasduzione del segnale (Figura 8) (Takeshita et al., 2001). A differenza di altri TLR, il TLR9 non è espresso sulla superficie cellulare delle cellule del sistema immunitario ma si trova localizzato nel reticolo endoplasmatico. Infatti, Leifer e collaboratori (2004) dimostrano che il TLR9, transfettato in cellule B e colorato con anticorpi fluorescenti, si localizzava nel compartimento reticolare e colocalizzava con markers specifici del reticolo endoplasmatico. Dal momento che il DNA viene internalizzato e digerito a livello di vescicole endosomiali rimaneva da chiarire come possa avvenire l'interazione con il TLR9 che si trova localizzato nel reticolo endoplasmatico.

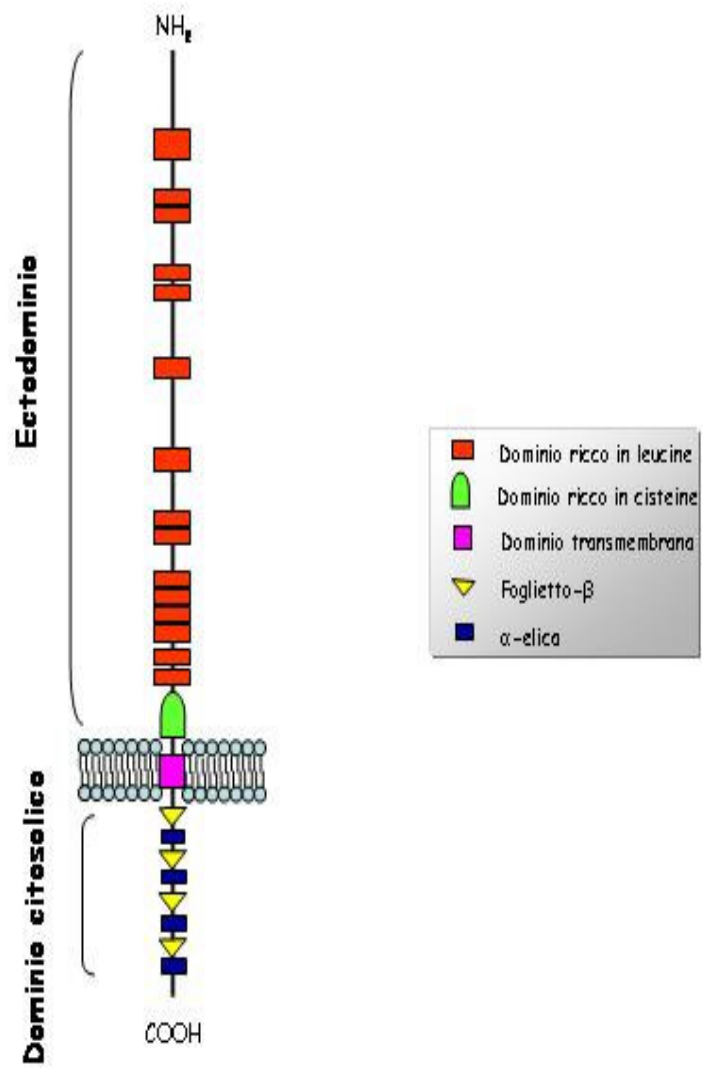


Fig 8: Schema strutturale del TLR9

Recenti studi hanno chiarito quest'aspetto dimostrando che, sebbene il TLR9 sia inizialmente localizzato nel reticolo endoplasmatico, quando il CpG-DNA è internalizzato attraverso l'endocitosi di vescicole rivestite da clatrina si assiste ad una rapida redistribuzione del recettore verso il compartimento cellulare in cui si verifica l'accumulo di CpG DNA (Lats et al., 2004). Il riconoscimento tra il recettore e le sequenze CpG procede in direzione 5'→3' e i motivi caratterizzati da sequenze inibitorie sono generalmente dominanti sui motivi stimolatori (Yamada et al., 2002). La cascata di trasduzione del segnale innescata dal legame del motivo CpG con il TLR9 è stata ampiamente analizzata ed attualmente si conoscono in dettaglio tutte le tappe. Il legame del ligando al recettore provoca presumibilmente la dimerizzazione del recettore stesso, con reclutamento della molecola adattatrice MyD88 (myeloid differentiation factor 88) tramite il dominio intracitoplasmatico. Ciò facilita l'associazione con la chinasi IRAK (Il-1R-associated kinase). La successiva autofosforilazione di IRAK permette la sua dissociazione dal complesso recettoriale e ne consente l'interazione con la molecola TRAF6 (TNF-receptor associated factor 6), un membro della famiglia delle proteine adattatrici. La cascata di traduzione del segnale prosegue con l'attivazione della chinasi TAK-1 (TGF- β activated kinase) da parte di

TRAF6, la quale porta alla fosforilazione e attivazione delle chinasi MAP (mitogen activated protein) sia all'attivazione di enzimi I κ B chinasi che fosforilano I κ B. Quest'ultimo fattore fosforilato lega residui di ubiquitina che lo indirizzano verso il proteasoma dove viene degradato e quindi libera il fattore di trascrizione NF- κ B, il quale può traslocare nel nucleo e legarsi a molti geni implicati nelle risposte infiammatorie ed immunitarie (Kandimalla et al., 2003).

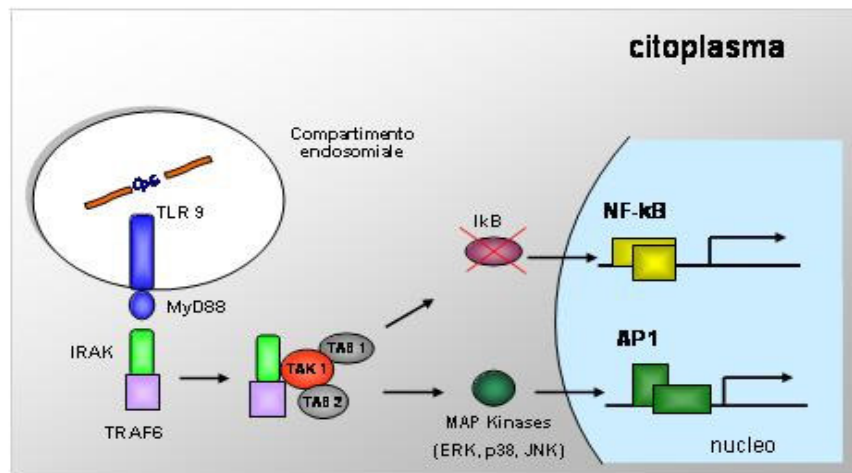


Fig 9: Cascata di trasduzione del segnale indotta dall'attivazione del TLR9

Premesse

Le relazioni che gli anellovirus instaurano con il sistema immunitario dell'ospite rappresentano uno degli aspetti più complessi da analizzare e sebbene alcune ipotesi siano state formulate molti aspetti devono essere ancora totalmente compresi. Un punto di fondamentale importanza dimostrato dal gruppo di ricerca di cui faccio parte è rappresentato dal fatto che TTV infetta produttivamente cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate, mentre non replica in cellule linfoidi che si trovano in fase stazionaria (Maggi et al., 2001b). Inoltre un altro studio condotto su bambini di età inferiore ai due anni affetti da patologie respiratorie di varia gravità, ha evidenziato una correlazione negativa tra titoli di TTV e percentuale di linfociti T totali e T CD4+, al contrario è emersa una correlazione positiva con la percentuale di linfociti B (Maggi et al., 2003b). Infine, non meno importante è stato lo studio condotto su soggetti sani vaccinati contro il virus dell'epatite B e il virus dell'influenza nel quale sono state esaminate le conseguenze dell'immunizzazione attiva sulla carica virale di TTV. I risultati hanno mostrato che l'immunizzazione contro antigeni non correlati induce variazioni di tipo transitorio nella viremia da TTV (Maggi et al., 2005).

Disegno e scopi dello studio

Lo studio si divide in due parti principali. La prima parte si propone di valutare il potenziale immunomodulante degli anellovirus analizzando il contenuto del dinucleotide CpG nel genoma di tali virus. Lo studio è stato condotto in silico su 60 sequenze virali complete presenti in banca dati. Si propone inoltre di valutare, se esiste una localizzazione preferenziale dei motivi CpG nel genoma virale ed infine di determinare, utilizzando criteri già presenti in letteratura, la natura di tali motivi.

Nella seconda parte, lo studio si propone di analizzare le complesse interazioni tra uno specifico isolato virale di TTV e il sistema immunitario mediante l'utilizzo di un modello *in vitro*, appositamente progettato, che consenta di valutare le eventuali variazioni indotte dal genoma virale nell'espressione di selezionate citochine.

Modello sperimentale

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati come modello sperimentale 10 topi sani adulti BALB/c allevati in ambienti liberi da patogeni. Gli animali sono stati sacrificati per traslocazione cervicale e splenectomizzati. In breve si pratica nell'ipocondrio di sinistra, con un bisturi chirurgico, un'incisione profonda fino al peritoneo; in questo modo viene localizzata la milza per il suo tipico colore rosso scuro e per la forma a semiluna ed è possibile isolarla dai tessuti adiacenti mediante la rimozione del tessuto connettivo. L'organo, dopo l'asportazione, è stato posto su una piastra Petri sterile e le cellule della milza sono state raccolte mediante "spremitura" della capsula fibrosa. Le cellule sono state lavate per due volte mediante risospensione in 15 ml di terreno RPMI e successiva centrifugazione a 600 g per 8 minuti per rimuovere ogni residuo della capsula. Il pellet cellulare così ottenuto è stato risospeso in 10 ml di terreno RPMI contenente glutammina all'1% e siero fetale bovino al 10%. Inoltre, un'aliquota della stessa sospensione cellulare è stata utilizzata per contare le cellule e determinare, in questo modo, l'esatto numero di cellule che è stato utilizzato nelle diverse fasi sperimentali.

Preparazione del DNA virale

Il genoma virale utilizzato nel presente studio appartiene ad un isolato classificato all'interno del genogruppo 4 di TTV, ottenuto dal plasma di una paziente affetta da artrite reumatoide. La prima parte del lavoro è stata la scelta di un efficiente metodo di estrazione e purificazione del DNA virale. Il kit commerciale utilizzato è stato il QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) che fornisce una semplice e rapida metodica di purificazione del DNA totale da sangue intero, plasma, siero, fluidi corporei, linfociti, colture cellulari e tessuti. Per l'estrazione sono stati utilizzati 200 µl di plasma a cui sono stati aggiunti 20 µl di proteinasi K e 200 µl di buffer AL che rappresenta il tampone di lisi. Al fine di ottenere una efficiente azione litica è essenziale vortexare per 15 secondi ed incubare a 56° C per 10 minuti. Si aggiunge un volume di 200 µl di etanolo (96-100%) per consentire la precipitazione degli acidi nucleici e si rende omogenea la miscela vortexando per 15 secondi, successivamente si esegue una breve centrifugata. La miscela così ottenuta è stata trasferita in colonne (QIAamp spin columns) contenenti una membrana di gel di silice e centrifugata a 6000 g per 1 minuto. Tale processo, insieme alle condizioni di salinità e di pH, permette il legame dell'acido

nucleico alla membrana e il passaggio nell'eluato di eventuali inibitori delle successive fasi di amplificazione. Le colonne sono state quindi lavate con 500 µl di buffer AW1 e centrifugate a 6000 g per 1 minuto a temperatura ambiente. Viene quindi effettuato un nuovo lavaggio con 500 µl di buffer AW2 e nuovamente si centrifuga ad elevata velocità (12000 g) per 3 minuti. Per evitare che residui di buffer AW2 possano inibire le successive fasi di amplificazione, dopo aver trasferito le colonne in tubi di scarico puliti si procede con una nuova centrifugazione ad elevata velocità per 1 minuto. L'ultima fase prevede il trasferimento delle colonne in eppendorf pulite e l'eluizione con 50 µl di buffer AE. Dopo aver incubato per 5 minuti a temperatura ambiente si centrifuga a 6000 g per 1 minuto. L'eluato ottenuto viene recuperato in quanto contiene l'acido nucleico e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Metodica di amplificazione dell'isolato

Dopo l'estrazione dell'acido nucleico è stato possibile, mediante l'utilizzo di metodiche di PCR appositamente studiate, ottenere l'amplificazione del completo isolato virale. I primers utilizzati sono stati progettati utilizzando il programma Primer Premier (Versione 5.00; Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) ed è stata rivolta una particolare attenzione all'assenza, nelle combinazioni di primer, di strutture secondarie a forcina o sequenze in grado di dimerizzare. In questo modo è stato quindi possibile progettare una prima strategia di amplificazione, che utilizzando una nested PCR con primers costruiti in una regione del genoma a cavallo tra l'UTR e l'ORF 2, ci ha consentito di ottenere un primo frammento di 3204 bp. Una seconda strategia di amplificazione, ha consentito, grazie allo studio di nuove coppie di primer e alla messa a punto di una nuova nested PCR, di completare l'intero isolato. Per entrambe le amplificazioni è stato utilizzato lo stesso protocollo: uniche differenze sono state le coppie di primer e la temperatura di annealing. Brevemente, per il primo step 5 µl di DNA estratto sono stati aggiunti a 45 µl della miscela di reazione contenente il tampone (10 mM Tris-HCl pH 8,2, 50

mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) 60 µM di ciascun primer e 2,5 U di Taq DNA polimerasi. Dopo aver preparato la miscela sono stati effettuati 35 cicli con il seguente profilo termico:

1. Fase di denaturazione: 94° C per 30 secondi
2. Fase di appaiamento: temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primers per 30 secondi
3. Fase di estensione: 72°C per 45 secondi

Al termine dei 35 cicli, la temperatura è stata mantenuta a 72 °C per 15 minuti affinché la Taq polimerasi completasse eventuali frammenti tronchi. Il secondo step è stato effettuato trasferendo 5 µl del prodotto del primo step in nuovi tubi di reazione contenenti una miscela simile a quella del primo step ma con primer interni rispetto al frammento già amplificato. Le reazioni sono state eseguite in termociclatori Perkin-Elmer 9600 (Applied Biosystem, Foster City, Calif.) e i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio colorato con etidio bromuro.

Sequenziamento dell'isolato

I due frammenti dell'isolato virale, ottenuti mediante le reazioni di PCR, sono stati successivamente analizzati mediante la tecnica del sequenziamento. Questa tappa è stata particolarmente delicata: infatti, per questo studio, è stato fondamentale determinare l'esatta sequenza nucleotidica con particolare attenzione al contenuto delle sequenze CpG poiché proprio queste ultime possono portare all'attivazione o all'inibizione di cascate del segnale che sono state analizzate. Le sequenze ottenute sono state effettuate utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 373 DNA Sequencer (PE, Biosystem) che, pur rifacendosi al metodo di Sanger, prevede alcune varianti. Il metodo automatico richiede l'uso di dideossinucleotidi marcati con fluorocromi diversi a seconda della base azotata che contengono e presenti in uno stesso tubo di reazione. I campioni, dopo che è avvenuta la reazione, opportunamente purificati, vengono denaturati, inseriti nel sequenziatore e sottoposti ad elettroforesi capillare durante la quale un sensore ottico rileva il passaggio di ogni filamento di DNA ed identifica se termina con ddA, ddC, ddG o ddT. L'identificazione è resa possibile dall'emissione di diversa fluorescenza emessa dai fluorocromi corrispondenti ad ogni

base in seguito all'eccitazione del raggio laser. Per sequenziare il frammento lungo (3204 bp) è stato necessario utilizzare la tecnica del *chromosome walking* mentre per il frammento corto dell'isolato è stato sufficiente utilizzare la coppia di primer utilizzati per amplificare il secondo step.

Clonaggio

Entrambi i frammenti sono stati clonati in vettori per ottenere notevoli quantità del DNA dell'isolato. La tecnologia del clonaggio comporta la costruzione di nuove molecole di DNA attraverso la saldatura di sequenze provenienti da fonti diverse. Il clonaggio del DNA è reso possibile grazie alla capacità che hanno i plasmidi batterici ed i fagi di mantenere il loro normale stile di vita anche dopo che sequenze addizionali di DNA sono state incorporate nei loro genomi. Una simile inserzione genera un plasmide o un fago ibrido costituito in parte dal DNA autentico del genoma originale ed in parte dalle addizionali sequenze "estranee". Questi elementi chimerici si replicano nei batteri esattamente come i plasmidi o i fagi originali e possono essere isolati in grandi quantità. Molti vettori contengono inoltre dei geni che conferiscono loro la resistenza ad uno o più antibiotici e questo è utile per realizzare gli esperimenti di clonaggio. Infatti, ciò permette la crescita, in un terreno selettivo, solo di quelle cellule batteriche che hanno al loro interno il plasmide. Una volta isolate le colonie d'interesse, si procede con l'estrazione del plasmide. Il clonaggio eseguito per questo lavoro è stato ottenuto utilizzando il kit commerciale QIAGEN® PCR Cloning.

Il kit è dotato di un vettore plasmidico pDrive Cloning Vector lineare della lunghezza di 3,85 kb, contenente al 3' una coda di poliT. Inoltre l'enzima topoisomerasi è legato covalentemente al vettore permettendo in questo modo la saldatura dell'inserto nel plasmide e la sua circolarizzazione (Figura 10). Infatti, in seguito alle caratteristiche di questo kit, è stato eseguito sull'amplificato da clonare un secondo step di PCR usando l'enzima Taq polimerasi. Esso aggiunge la coda di poliA necessaria per la complementarietà dell'inserimento del frammento nel plasmide. L'estension finale è stata prolungata per 30 minuti alla temperatura di 72°C al fine di ottenere un inserto di lunghezza completa e per non perdere l'adenilazione. Dopodiché, l'amplificato è stato corso mediante elettroforesi in gel con una percentuale di agarosio pari all'1,5% ed è stata estratta la banda d'interesse. Contemporaneamente si è proceduto alla preparazione del terreno di coltura. Il terreno che è stato usato per la coltura liquida è LB (Luria-Bertini) composto da: 10% di triptone, 0,5 % di estratto di lievito, 1% di NaCl pH 7,0; mentre per la coltura su piastra, si aggiunge l'agar all'LB e si autoclava a ciclo liquido per 20 minuti a 15 psi. Prima di colare il terreno sulle piastre

Petri, si aggiunge l'antibiotico kanamicina che raggiunge la concentrazione finale di 50 µg/ml. Le piastre così preparate si

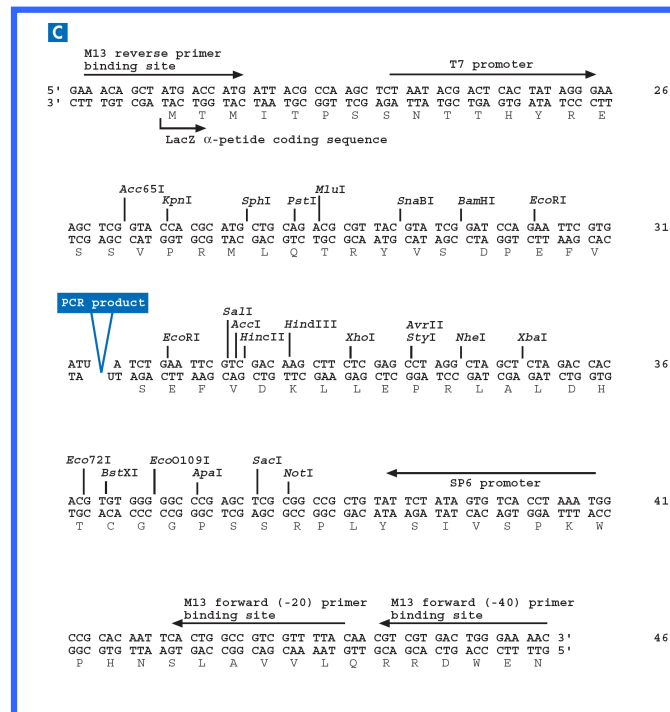
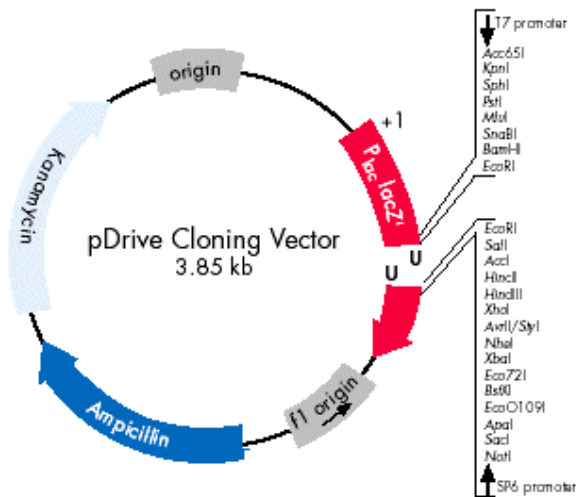


Fig. 10: Mappa e siti di restrizione del plasmide prive Cloning Vector (dal manuale Qiagen).

conservano a 4°C. Il passo successivo consiste nell'inserimento del frammento amplificato all'interno del plasmide (ligation). Per la reazione si preparano 10 µl della seguente miscela:

Prodotto di PCR	1 µl – 4 µl
Ligation Master Mix 2x	5 µl
Acqua sterile	differenza
Prive Cloning Vector (50 ng/µl)	1 µl

La quantità del prodotto di PCR varia in base all'intensità della banda osservata sul gel di agarosio e in base alla lunghezza del frammento. La miscela così ottenuta è stata incubata per tutta la notte nel termocicizzatore alla temperatura di +8°C e conservata a -20°C. Le cellule che sono state usate per il clonaggio sono un ceppo di E.coli denominato TOP10F'. Esse non presentano resistenza verso l'antibiotico kanamicina, non sono in grado di metabolizzare il galattosio e sono chimicamente competenti. L'inserimento del plasmide ricombinante all'interno delle cellule competenti si è ottenuto trasferendo 2 µl della ligation ad uno stock di cellule TOP10F,' mescolando gentilmente e trasferendo in ghiaccio per 30 minuti. Tutto ciò, infatti, sembra favorire l'entrata del plasmide all'interno delle cellule. Dopo l'incubazione, per riattivare il

metabolismo cellulare, è stato necessario incubare per 30 secondi esatti a 42°C. A questo punto, si è proceduto con una precrescita rapida delle cellule in un terreno non selettivo e molto ricco chiamato SOC (2% triptone, 0,5% estratto di lievito, NaCl 10mM, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ e 20 mM di glucosio) per 30 minuti in termostato alla temperatura di 37°C. La crescita batterica è stata visualizzata dall'intorbidamento del terreno; quindi si è proceduto alla coltura su piastra. Le cellule TOP10F', come detto in precedenza, non sono in grado di metabolizzare il galattosio e non hanno il gene per la resistenza alla kanamicina, quindi per selezionare le cellule che contengono il plasmide ricombinante sono stati aggiunti alle piastre contenenti il terreno LB agarizzato e kanamicina, 100 µl di coltura liquida, 40µl di isopropiltiogalattoside (IPTG) 100 mM e 40 µl di X-GAL da uno stock 20 mg/ml. Infatti, l'IPTG è necessario perché funziona da induttore non metabolizzabile della β -galattosidasi agendo sull'operone del galattosio; mentre l'X-GAL è un analogo del galattosio che contiene un gruppo cromogeno il quale permette di visualizzare se è avvenuta la sua metabolizzazione. Nel terreno cresceranno le cellule che, grazie al plasmide, hanno acquistato la resistenza alla kanamicina. Inoltre, per il nostro scopo è importante selezionare quelle cellule che hanno al loro

interno il plasmide ricombinante. Questo si può fare grazie al fatto che l'inserito di PCR si inserisce all'interno del plasmide andando ad interrompere il gene per la β -galattosidasi e impedendo quindi all'X-GAL di essere metabolizzato. Ciò provocherà, grazie alle proprietà cromogene del substrato, colonie di colore bianco. Al contrario, le cellule che conterranno il plasmide privo dell'inserito, potranno metabolizzare l'X-GAL e quindi svilupperanno colonie blu. Per consentire la crescita delle colonie, le piastre sono state messe in termostato a 37°C per una notte. Il giorno seguente è stata osservata la presenza di colonie blu e di colonie bianche; se il clonaggio è stato efficiente si dovranno osservare poche colonie blu rispetto alle bianche. A questo punto, per passare alla colonia pura, sono state selezionate alcune colonie bianche e sono state seminate in tubi contenenti 3 ml di terreno liquido LB con kanamicina (50 μ g/ml) ed incubate a 37°C per una notte per consentirne la crescita. Il giorno seguente la coltura liquida è stata nuovamente piastrata su LB agarizzato e le piastre sono state incubate per un'altra notte a 37°C. A questo punto, dopo vari passaggi, sono state ottenute le colture pure. Le colonie sono state riseminate in 180 ml di terreno liquido LB contenente kanamicina e fatte crescere a 37°C per una notte.

Estrazione plasmidica endotoxin free

L'endotossina, conosciuta anche con il termine di lipopolisaccaride o LPS, è spesso co-purificata insieme al DNA plasmidico. In questo studio è stato indispensabile eliminare ogni traccia di questo contaminante in quanto tutti gli esperimenti e le successive analisi potevano essere alterate dalla sua presenza. Per questo motivo, le colonie ricombinanti sono state estratte utilizzando il kit commerciale GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Maxiprep (Sigma) che offre un rapido metodo per isolare fino a 1,2 mg di plasmide purificato dall'endotossina. Il protocollo prevede che le colture di E.coli ricombinanti cresciute per una notte in terreno LB liquido contenente l'antibiotico vengano centrifugate a 3000-5000 g per 5 minuti e risospese in 4,8 ml di Resuspension Solution, mentre la lisi alcalina delle cellule batteriche viene ottenuta mediante l'aggiunta della Lysis Solution. Si procede con la precipitazione dei detriti cellulari aggiungendo 3,2 ml di Neutralization Solution e successiva centrifugazione a 15000 g per 15 minuti. La fase di rimozione dell'endotossina prevede l'aggiunta di 1,2 ml di Endotoxin Removal Solution al lisato cellulare e successiva incubazione in ghiaccio per 10 minuti. Il sovranatante così ottenuto viene recuperato e trasferito in colonne contenenti una matrice in grado di legare il DNA

plasmidico; si procede quindi con una serie di lavaggi e centrifugazioni a 3000-5000 g per ottenere un'alta purificazione del plasmide. Infine si procede con la fase di eluizione che prevede l'aggiunta di 1 ml di acqua Endotoxin Free alle colonne e successiva centrifugazione a 3000-5000 g per 5 minuti. L'eluato così ottenuto, contenente il DNA plasmidico, è libero da ogni traccia di endotossina ed è pronto per le successive fasi sperimentali.

Digestione plasmidica

Gli inserti del genoma virale sono stati tagliati dal vettore mediante digestioni enzimatiche. Per ottenere l'escissione del frammento corto è stato sufficiente effettuare una singola digestione con l'enzima EcoRI (Fermentas) mentre per ottenere il frammento di 3204 bp è stato necessario progettare 2 digestioni enzimatiche rispettivamente con l'enzima di restrizione PdmI (Fermentas), e successivamente con l'enzima EcoRI (Fermentas), poiché una digestione con un solo enzima non era sufficiente per discriminare nettamente, rispetto alle dimensioni, il vettore dall'inserto. Il digerito è stato purificato e corso su un gel di agarosio all'1,5% e sono state estratte le bande d'interesse con il kit commerciale GenElute™ Gel Extraction (Sigma). Il DNA così estratto è stato concentrato tramite l'utilizzo di microconcentratori (Millipore) e risospeso in acqua apirogena. Un'aliquota di estratto è stata inoltre testata con LAL-test (lisato di amebociti di *Limulus*) per verificare che non si abbia una contaminazione da endotossina superiore a 0,03 unità endotossiniche /ml.

Fase Sperimentale

Tutti gli esperimenti condotti sulle cellule di milza sono stati progettati con uno schema comune.

Le cellule ottenute dalla milza di topo sono state poste in coltura in piastre da 24 pozzetti (3×10^6 cellule per pozzetto) e incubate a 37°C al 5% di CO₂ con solo terreno RPMI (1% glutammina, 10% siero fetale bovino) per il controllo negativo e con differenti stimoli: LPS 50ng/ml, concanavalina A (ConA) 5 µg/ml, ODN 6 µg, genoma di TTV (range 1-24 µg) da solo o combinato con ODN. La stimolazione delle cellule con il DNA virale e gli ODN è stata effettuata in presenza o in assenza di una quantità standard di lipofectina (25 µg), reagente che facilita la trasfezione del DNA all'interno delle cellule. Gli splenociti stimolati e i rispettivi controlli non trattati, sono stati recuperati a differenti intervalli di tempo (4, 8, 12, 24 ore post stimolazione) ed analizzati per l'espressione genica di diverse citochine. Inoltre un'aliquota di cellule né piastrata né trattata è stata utilizzata, dopo estrazione dell'RNA totale e quantificazione allo spettrofotometro, per valutare l'efficienza della real-time PCR.

Preparazione dei complessi DNA-lipofectina

Affinché si abbia la formazione dei complessi la lipofectina (25 µg) è stato diluita in terreno RPMI in assenza di siero e incubata a temperatura ambiente per 30-45 minuti. In seguito, la lipofectina così preparata è stata combinata con diverse quantità di DNA virale precedentemente reso a singolo filamento mediante denaturazione a 94°C e anch'esso diluito in terreno privo di siero. I complessi DNA-lipofectina si formano dopo un'incubazione di 10-15 minuti a temperatura ambiente.

Estrazione dell'RNA totale

Il kit utilizzato per l'estrazione dell'mRNA delle citochine dalle cellule di milza di topo è stato Rneasy Mini kit (Qiagen). Questo kit fornisce una rapida metodica per la purificazione dell'RNA da cellule animali; questa tecnologia combina le proprietà selettive di legame ad una membrana di silice con la velocità delle microcentrifugate. I pellet di cellule di milza ottenuti dopo 12 h di incubazione sono stati per prima cosa lisati e omogenizzati in presenza di un buffer denaturante contenente guanidina-tiocianato per inattivare immediatamente le RNasi che potrebbero degradare l'RNA. In seguito la precipitazione dell'RNA è stata ottenuta mediante l'aggiunta di un volume di etanolo al 70%. Il campione è stato quindi trasferito nelle Rneasy Mini spin column dove l'RNA totale si lega alla membrana delle colonne ed i contaminanti vengono eliminati attraverso lavaggi con vari buffer. L'RNA totale è stato infine eluito in 50 µl di acqua libera da RNasi. L'RNA totale è stato quindi quantificato e aliquotato in provette contenenti 1 µg di RNA.

Real-time PCR

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA mediante l'utilizzo del kit commerciale RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) e successivamente analizzato per quantificare l'espressione di diverse citochine. Ciò è stato possibile grazie all'utilizzo di una innovativa tecnica di Real-Time PCR che impiega il sistema *MGB Eclipse Probe*. Tale sistema si avvale di una particolare sonda che presenta al 5' il fluorocromo *reporter* (6-carbossi-fluoresceina, FAM o VIC) ed all'estremità 3' una molecola *dark quencer* capace di mascherare la fluorescenza emessa dal reporter. Tale sonda contiene inoltre particolari gruppi MGB (*Minor Groove Binder*), che derivano dagli antibiotici e che hanno la proprietà di stabilire un legame stabile al solco minore del DNA (Figura 11); questo legame di natura idrofobica che si viene a creare tra il DNA e la sonda MGB aumenta la temperatura di *melting* di quest'ultima e permette quindi di utilizzare sonde a sequenza più breve, con conseguente aumento di specificità del test. Nella fase di denaturazione la sonda, grazie alla sua alta idrofobicità, assume una conformazione random cosicché il *dark quencer*, trovandosi in vicinanza del reporter maschera la fluorescenza emessa dal reporter stesso. Tale fluorescenza è invece emessa durante la successiva fase di *annealing* durante la quale la

sonda legandosi alla sequenza target, permette l'allontanamento del dark quencher dal reporter. Il legame formatosi è stabilizzato dalla molecola MGB che si colloca nel solco minore del DNA a doppio filamento. Durante la fase di estensione la sonda si stacca dalla sequenza target riassumendo la conformazione iniziale. La quantità di fluorescenza emessa, che dipende dai ripetuti cicli di PCR, risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di DNA target presente nel campione in esame. Dal momento che la sonda presenta una specificità molto elevata è teoricamente impossibile ottenere delle reazioni con falsi positivi dovuti ad aspecifici segnali di fluorescenza.

Il segnale di fluorescenza emesso è misurato ed interpretato dal sistema Applied Biosystems Prism 7700 che è costituito da un termocicizzatore, un laser per indurre la fluorescenza, un rilevatore CCD (charge-coupled device) ed un software di elaborazione. Tale software calcola e normalizza il ΔR_n , ovvero il parametro di fluorescenza che riflette i cambiamenti della fluorescenza stessa del reporter dopo aver sottratto il segnale ottenuto nei primi 3-15 cicli di amplificazione, quando ancora la sonda ibridata non è ancora rilevabile. Il software, per

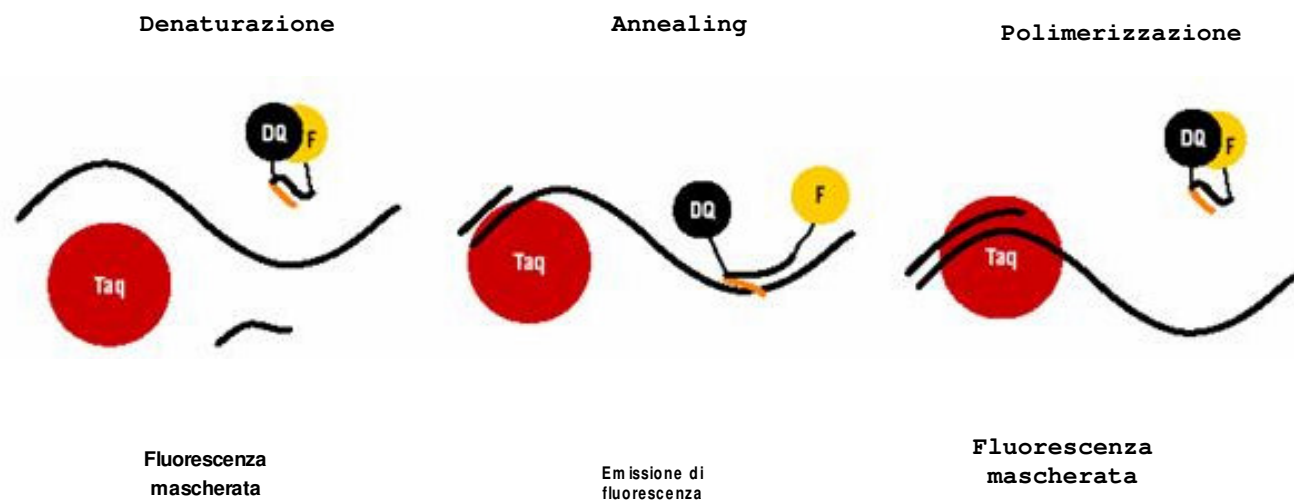


Fig. 11 : Schema di funzionamento delle sonde MGB

normalizzare il ΔR_n , e quindi correggere le inevitabili fluttuazioni della fluorescenza dovute alle variazioni di concentrazione o di volume dei campioni analizzati, deve tener conto del picco di segnale di un terzo colorante non coniugato (rodamina, ROX), che è incluso in concentrazione costante nel tampone di reazione e il cui segnale sostanzialmente non cambia durante l'amplificazione. Inoltre tale colorante non è sottoposto all'azione nucleasica della polimerasi.

Il software calcola anche il ciclo soglia o C_t , che indica il primo ciclo in cui si ha un incremento statisticamente significativo del ΔR_n , e che rappresenta il momento iniziale della crescita esponenziale dei prodotti di PCR. Tutti i campioni sono stati testati in triplo nella stessa seduta, e la valutazione della quantificazione ottenuta non è stata ritenuta attendibile ogni volta che risultavano coefficienti di variazione superiori al 50%; in questo caso è stato ritenuto necessario ripetere il campione.

La polimerasi impiegata nella Real-Time è la AmpliTaq Gold™, un'enzima termostabile che risulta essere estremamente sensibile anche verso sequenze bersaglio presenti a bassissimo numero di copie.

La miscela di amplificazione del volume totale di 20 μ l è costituita da:

- ✓ **Primer e probe:** sintetizzati da Applied Biosystem; ed ogni saggio di espressione genica è costituito da FAMTM dye-labeled TaqMan® MGB probe e di due set di primer formulati all'interno di un'unica miscela. Ogni saggio è stato ottimizzato per correre con condizioni termiche universali e con una concentrazione finale nella reazione per la sonda e per ogni primer pari a 250 nM e 900 nM rispettivamente.
- ✓ **TaqMan Universal Master Mix** alla concentrazione finale 1X. Tale miscela, oltre alla polimerasi AmpliTaq GoldTM, contiene:
 - AmpErase uracil-N-glycosilase** (UNG) che previene l'amplificazione dei prodotti di PCR contaminati;
 - DNTPs** con dUTP al posto di dTTP;
- ✓ 5 µl del **cDNA** estratto pari ad una concentrazione di 10-100 ng;
- ✓ x µl di acqua deionizzata a volume.

L'amplificazione è condotta dal sistema ABI 7700 con il seguente profilo ciclico: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti affinché si attivi la UNG; 1 ciclo a 95°C per 10 minuti per permettere

l'attivazione della AmpliTaq Gold polimerasi; 40 cicli alle seguenti condizioni: 95°C per 15 secondi (denaturazione) e 60°C per 1 minuto (ibridazione dei primers ed estensione).

Analisi dell'espressione genica

L'espressione genica delle citochine analizzate è stata calcolata mediante quantizzazione relativa dal "Relative expression software tool" (REST). Tale metodo compara il Ct della citochina di interesse con il Ct generato da un campione di riferimento chiamato "calibratore" (cellule di milza non stimolate). Il software normalizza l'espressione delle citochine testate rispetto all'espressione di un gene espresso costitutivamente (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi GAPDH) mediante il valore del ΔCt ("Ct interleuchina" meno "Ct GAPDH"). Calcola quindi il $\Delta\Delta Ct$ come differenza tra i valori di ΔCt delle cellule stimolate e i valori di ΔCt delle rispettive cellule non stimolate. Infine, la differenza relativa di espressione (R) delle interleuchine tra gli splenociti stimolati e le rispettive cellule non stimolate viene calcolata applicando la seguente formula:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{media controllo} - \text{media campione})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{media controllo} - \text{media campione})}}$$

In tale formula, E rappresenta l'efficienza della reazione di PCR. Tale efficienza è stata calcolata mediante la real-time PCR analizzando diluizioni scalari di un pool di cDNA derivante da cellule della milza che non sono stati né trattati né messi in coltura. I Ct calcolati per ogni citochina e per il gene endogeno rispetto ai nanogrammi di cDNA sono stati utilizzati per

tracciare una retta dalla cui pendenza è possibile ricavare il valore dell'efficienza applicando la seguente formula $E=10(-1/pendenza)$. Il test è in grado di stabilire se il gene analizzato è sovraespresso o sottoespresso ed inoltre elabora i dati inseriti attraverso il test di randomizzazione che fornisce un corrispondente valore statistico di significatività rispetto al controllo non trattato.

Analisi statistica

Le differenze tra le medie sono state stimate mediante il test t di Student a due code. Tutti i test sono stati eseguiti adoperando il programma SPSS versione 8.0 per windows.

1. Studio del numero dei motivi CpG

L'iniziale obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il numero dei motivi CpG presenti nel genoma dei virus classificati nel genere *Anellovirus* e, in seguito, di verificare l'esistenza di eventuali differenze nel numero di tali motivi tra i 5 genogruppi in cui TTV, il prototipo degli anellovirus, è attualmente distinto. Per tale studio sono state analizzate 60 sequenze presenti in banca dati al marzo 2007 e rappresentative di genomi virali interi.

1.1 Numero dei motivi CpG per kb

Il primo parametro valutato è stato il numero di motivi CpG presenti per kb di genoma virale; dall'analisi è emerso che, tra gli anellovirus attualmente conosciuti, esistono importanti differenze quantitative di questo parametro. Infatti come riportato in Tabella 3 gli isolati di TTV hanno mostrato il numero medio di motivi CpG per kb più alto rispetto agli altri anellovirus, con differenze che raggiungono una significatività statistica. Al contrario gli isolati di TTMV e SAV mostravano i valori di CpG per kb più bassi in assoluto. E' da notare inoltre che gli isolati appartenenti a TTV mostravano un range di variabilità molto più ampio rispetto a quello degli altri virus.

Anellovirus	N° isolati esaminati	N° di motivi CpG per Kb	
		Media \pm DS	range
TTV	44	48,8 \pm 5,2 ^a	38,7-61,6
TTMDV	3	29,0 \pm 0,4	28,7-29,5
TTMV	11	18,2 \pm 1,7	15,3-21,4
SAV	2	11,8 \pm 2,2	10,2-13,3

Tab 3: Analisi del numero di motivi CpG presenti negli anellovirus a statisticamente differente rispetto a TTMDV [$p \leq 0.001$], TTMV [$p \leq 0.001$], SAV [$p \leq 0.001$]

Per comprendere i motivi di tale variabilità e per valutare se ciò dipendesse da isolati appartenenti ad uno specifico genogruppo del virus, le sequenze di TTV sono state suddivise in base all'appartenenza del genogruppo ed è stato calcolato nuovamente il contenuto medio dei motivi CpG per kb. Come si evince dalla Tabella 4 i valori medi calcolati per ogni gruppo sono molto simili tra di loro, oscillando attorno al valore medio totale precedentemente calcolato. Da notare inoltre come il genogruppo 1 mostri un range di variabilità più ampio rispetto agli altri gruppi di TTV.

Genogruppo di TTV	N° isolati	N°motivi CpG per Kb	
		Media \pm DS	range
1	12	48,8 \pm 6,8	38,7-59,1
2	7	47,6 \pm 3,7	42,6-52,4
3	8	49,7 \pm 4,2	42,6-54,7
4	9	52,2 \pm 3,9	48,7-61,6
5	9	45,2 \pm 4,2	39,9-50,1

Tab.4: Analisi del numero dei motivi CpG presenti nei 5 genogruppi di TTV

1.2 Frequenza dei motivi CpG

Un altro obiettivo è stato di valutare in base a quanto proposto da Karlin et al. (1994) se una particolare sequenza avesse un alto ($\rho_{\text{CpG}} \geq 1,25$) o un basso ($\rho_{\text{CpG}} \leq 0,78$) numero di motivi CpG rispetto a quello atteso per una associazione random. Tale valutazione è stata possibile utilizzando la formula $\rho_{\text{CpG}} = \rho_{\text{CG}} / \rho_{\text{C}} \times \rho_{\text{G}}$ che deriva dal rapporto tra la frequenza del dinucleotide CG diviso il prodotto della frequenza del nucleotide C per la frequenza del nucleotide G. Quest'analisi ha evidenziato che, come accade per gli altri genomi virali dei vertebrati con lunghezza inferiore a 30 kb, anche gli anellovirus hanno un contenuto di motivi CpG relativamente ridotto. Ciò risulta particolarmente evidente per le sequenze di TTMV e SAV per le quali sono stati calcolati valori medi di ρ_{CpG} rispettivamente di 0,52 e 0,32. Inoltre è possibile notare che le sequenze di TTV hanno valori di ρ_{CpG} significativamente più alti rispetto alle sequenze di tutti gli altri anellovirus (Tabella 5).

Anellovirus	N°isolati	pCpG	
		Media \pm SD	range
TTV	44	0,74 \pm 0,047 ^a	0,64-0,84
TTMDV	3	0,65 \pm 0,007	0,64-0,65
TTMV	11	0,52 \pm 0,036	0,48-0,59
SAV	2	0,32 \pm 0,064	0,27-0,36

Tab. 5: Analisi delle frequenze dei motivi CpG presenti nel genoma degli anellovirus.

a) statisticamente differente rispetto a TTMDV ($p= 0.002$), TTMV ($p\leq 0.001$) e SAV ($p\leq 0.001$)

2. Studio della natura dei motivi CpG

L'influenza che i motivi CpG hanno sul sistema immunitario non è solo determinata dal loro valore numerico, ma hanno un ruolo fondamentale anche le caratteristiche biochimiche delle basi adiacenti. Infatti, in base alla natura, di tali basi adiacenti, si individuano motivi CpG immunostimolatori e inibitori o neutralizzanti. Dal punto di vista biochimico il dinucleotide CpG è ritenuto immunostimolatorio quando è preceduto all'estremità 5' da due basi puriniche, soprattutto ApA o GpA o GpT, ed è seguito all'estremità 3' da due pirimidine, specialmente TpT; al contrario i motivi neutralizzanti sono ritenuti tali quando si ritrovano nella sequenza numerosi dinucleotidi CpG direttamente ripetuti (Yi et al., 1996).

E' stato, quindi, interessante condurre uno studio sulla natura di tali motivi negli anellovirus. Gli esameri stimolatori ed i motivi inibitori ricercati in tutti gli isolati sono stati dedotti dalla letteratura (Lundenberg et al., 2003) e la loro sequenza è riportata in Tabella 6. Per questo studio i parametri che meglio rappresentano la frequenza di tali motivi sono definiti dal ρ -esameri stimolatori e ρ -esameri inibitori

Motivi CpG	
stimolatori	inibitori
AAcgTT	Ccg
AAcgTC	cgA
AAcgCT	cgG
AAcgCC	
GGcgTT	
GGcgTC	
GGcgCT	
GGcgCC	
AGcgTC	
AGcgCT	
AGcgCC	
GAcgTT	
GAcgTC	
GAcgCT	
GAcgCC	

Tab. 6: Elenco dei principali motivi stimolatori e inibitori secondo Lundenberg et al. (2003)

calcolati dal rapporto tra la frequenza degli osservati e la frequenza degli attesi. In Tabella 7 sono riportati i valori medi di tali frequenze per i diversi virus.

Anellovirus	N° isolati	p osservati/attesi	
		Stimolatori (media \pm DS)	Inibitori (media \pm DS)
TTV	44	80 \pm 21,4 ^a	75,6 \pm 4,8
TTMV	11	66,6 \pm 26,5	63,3 \pm 9,4
TTMDV	3	55,6 \pm 10,5	55,9 \pm 3,4
SAV	2	11,8 \pm 22,8	40,8 \pm 12,3

Tab. 7: Analisi delle frequenze dei motivi CpG stimolatori e inibitori presenti negli anellovirus

a) statisticamente differente rispetto a SAV ($p \leq 0,001$)

Come possiamo osservare, in TTV, TTMV e TTMDV il valore medio di ρ per gli esameri stimolatori è paragonabile al valore medio per gli esameri inibitori mentre per gli isolati SAV, almeno per le due sequenze attualmente presenti in banca dati, appare una maggiore frequenza di motivi inibitori rispetto a quelli stimolatori. Inoltre, riguardo ai motivi stimolatori, esistono differenze statisticamente significative tra i diversi virus e in particolare fra TTV e SAV. Per TTV è stato anche valutato se i motivi stimolatori e inibitori fossero diversamente rappresentati all'interno dei diversi genogruppi. Quest'analisi ha evidenziato che i motivi inibitori sono uniformemente distribuiti senza alcuna differenza fra i diversi gruppi di TTV. Una maggiore variabilità, sebbene non statisticamente significativa, si osserva invece per i motivi stimolatori: il genogruppo 2 mostra i valori medi più bassi (69.4 ± 36.2), mentre il genogruppo 4 quelli più alti (93.3 ± 15.2) (Tabella 8).

Genogruppo di TTV	N° isolati	p-osservati/attesi	
		Stimolatori (media ± SD)	Inibitori (media ± SD)
1	12	86.6 ± 15.6	72.4 ± 5.3
2	7	69.4 ± 36.2	76.5 ± 6.2
3	8	74.1 ± 16.5	76.3 ± 4.3
4	9	93.3 ± 15.2	76.4 ± 3.2
5	9	70.6 ± 14.9	77.8 ± 3.2

Tab. 8: Analisi delle frequenze dei motivi stimolatori e inibitori nei 5 genogruppi di TTV.

3. Studio della localizzazione genomica dei motivi CpG

Altro aspetto valutato riguarda la localizzazione dei motivi CpG all'interno del genoma; questo studio è stato condotto su isolati appartenenti a TTV poiché su questo virus si hanno informazioni più precise circa l'organizzazione del genoma rispetto a tutti gli altri anellovirus. Suddividendo il genoma di TTV in due porzioni, la regione non codificante (UTR) e quella codificante, è emerso che i dinucleotidi CpG non sono uniformemente distribuiti nel genoma dei diversi isolati di TTV. Infatti, calcolando il numero di CpG per kb, appare una prevalente localizzazione nell'UTR rispetto alla regione codificante (Figura 12) e questo risulta essere vero per tutti i genogruppi di TTV.

Dopo aver osservato questa differenza nella localizzazione genomica del numero dei CpG, è stato interessante andare anche a valutare la natura di questi motivi nelle due differenti regioni genomiche. Per alcuni degli isolati di TTV è stata anche calcolata la frequenza dei motivi stimolatori e inibitori presenti nell'UTR e nella regione codificante. I dati riportati in Tabella 9 dimostrano che non esiste una preferenziale localizzazione dei due motivi in una particolare

regione genomica ma che al contrario le frequenze riscontrate nell'UTR e nella porzione codificante sono del tutto paragonabili.

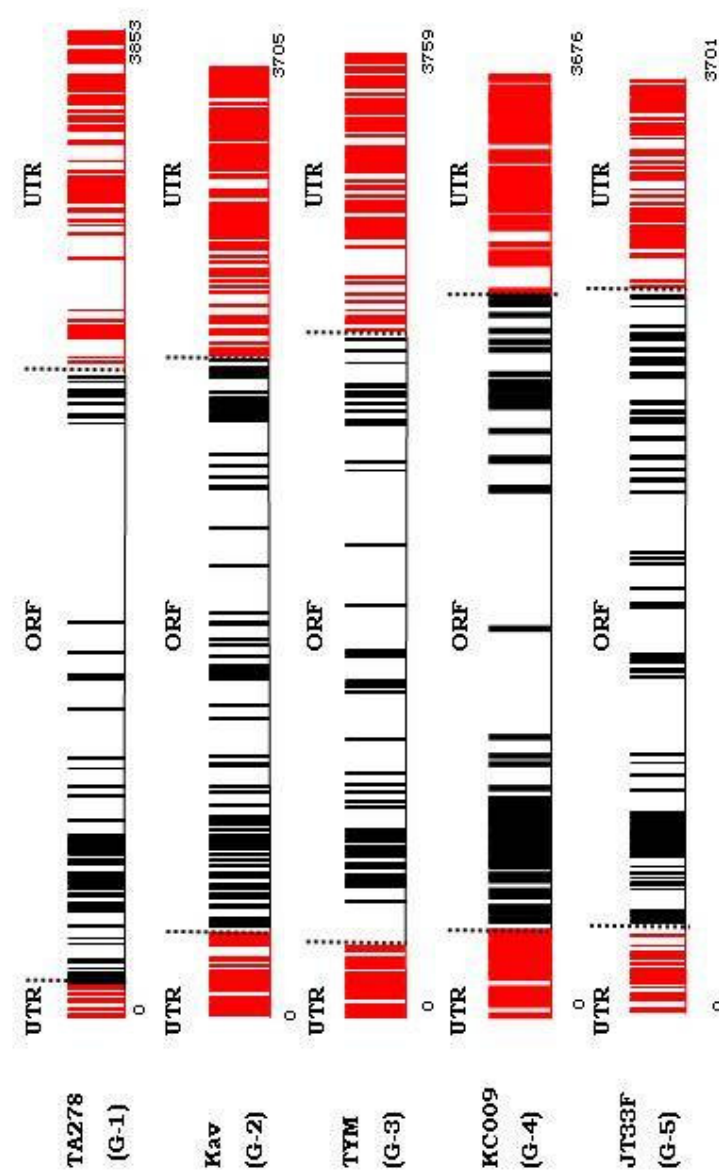


Fig 12: Rappresentazione grafica della localizzazione dei motivi CpG nel genoma di 5 isolati appartenenti ai differenti gruppi di TTV.

Genogruppo di TTV	N° isolati	UTR (media± DS)		ORF (media± DS)	
		p -stimolatori	p -inibitori	p -stimolatori	p -inibitori
1	4	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.06	0.5 ± 0.1
2	3	0.5 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.6	0.7 ± 0.1
3	3	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1
4	3	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2
5	3	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1

Tab. 9: Analisi delle frequenze dei motivi CpG stimolatori e inibitori nell'UTR e nell'ORF di alcuni isolati di TTV

4. Calcolo ed applicazioni dell'indice CpG

Tutti i parametri calcolati nei precedenti studi sono stati utilizzati, come suggerito da Lundemberg et al., (2003) per calcolare un indice che permette di paragonare il potenziale immunostimolatorio di diversi isolati virali indipendentemente dalla differente lunghezza del loro genoma, dal numero di CpG per kb e dalla frequenza del dinucleotide CpG. I valori di questo indice sono stati ottenuti applicando la formula:

$$I = (\rho_{\text{stimolatori}} - \rho_{\text{inibitori}}) \times (\text{CpG/kb}) \times \rho_{\text{CpG}}$$

L'indice è stato calcolato, oltre che sul filamento parentale negativo, anche sul filamento complementare invertito; tuttavia i valori ottenuti non hanno mostrato differenze significative.

Come possiamo notare dalla Tabella 10, si evidenzia un'elevata variabilità nell'indice CpG tra i diversi anellovirus. TTV mostra infatti il valore dell'indice CpG più elevato mentre SAV quello più basso.

Anellovirus	N° Isolati	Genoma		Odds ratio (%)				Indice CpG
		Lunghezza (kb)	CpG/kb	pCpG		motivo		
				Stimolatorio	Inibitorio	Stimolatorio	Inibitorio	
TTV	44	3,8±0,1	48,8±5,2	74,5±4,6	80±21,4	75,6±4,8	2,1±8,3	
TTMDV	3	3,2±0,01	29,1±0,4	64,3±0,7	55,6±10,5	55,9±3,4	0,03±1,9	
TTMV	11	2,9±0,1	18,2±1,8	52,2±3,6	66,6±26,5	63,3±9,4	0,3±3,1	
SAV	2	2,4±0,3	11,8±2,2	31,7±6,9	16,2±22,8	40,8±12,3	-2,1±1,7	

Tab. 10: Analisi dell'indice CpG negli anellovirus

Tutti i numeri rappresentano la media ± DS

Risultati interessanti emergono anche dall'analisi dei diversi genogruppi di TTV. L'analisi dei valori medi dell'indice CpG nei diversi genogruppi di TTV rivela importanti differenze che in molti casi raggiungono la significatività statistica. Tali differenze lasciano supporre la possibilità di una diversa capacità immunomodulante dei differenti gruppi. In particolare, la maggior parte delle sequenze di TTV appartenenti ai gruppi 1 e 4 mostrano valori dell'indice positivi, suggerendo un possibile effetto immunostimolatorio di queste sequenze con induzione di una probabile risposta infiammatoria. Al contrario, la quasi totalità delle sequenze di gruppo 5 presenta un indice negativo predittivo di un probabile effetto inibitorio di questi genomi sulla produzione di citochine pro-infiammatorie (Tabella 11).

Genogruppo di TTV	Genoma		Indice CpG
	Longhezza (kb)	CpG/kb	
1	3,822	48,8	5,9 ± 6.1
2	3,75	47,57	-2,39 ± 13.9
3	3,795	49,7	-0,8 ±4.9
4	3,671	52,2	7,0 ±5.9
5	3,741	45,2	-2,5 ± 5.1

Tab.11: Analisi dell'indice CpG nei genogruppi di TTV

Test Mann-Whitney :
5 vs 4: p = 0.0025
5 vs 1: p = 0.0038
3 vs 4: p = 0.0055
3 vs 1: p = 0.045

L'elevata variabilità dell'indice CpG non è presente solo tra i diversi genogruppi ma la si ritrova anche all'interno di uno stesso gruppo di TTV. Ciò è particolarmente evidente per gli isolati appartenenti al gruppo 2 al cui interno si individuano sequenze con indici CpG positivi e negativi. Analizzando tali sequenze dal punto di vista filogenetico, esse appaiono anche geneticamente molto distanti come dimostra il loro raggrupparsi in due rami separati dell'albero filogenetico (Figura 13). Infine, allo scopo di capire se esiste all'interno degli isolati di TTV una porzione genomica in grado di rappresentare l'indice calcolato sull'intero genoma, per alcuni isolati virali l'indice è stato calcolato nella regione corrispondente al gene ORF1. I risultati in Tabella 12 dimostrano che, in generale, l'indice calcolato nell'ORF1 non corrispondeva a quello calcolato sull'intero genoma, confermando così la necessità che l'indice CpG sia valutato sulla base dell'intera sequenza virale.

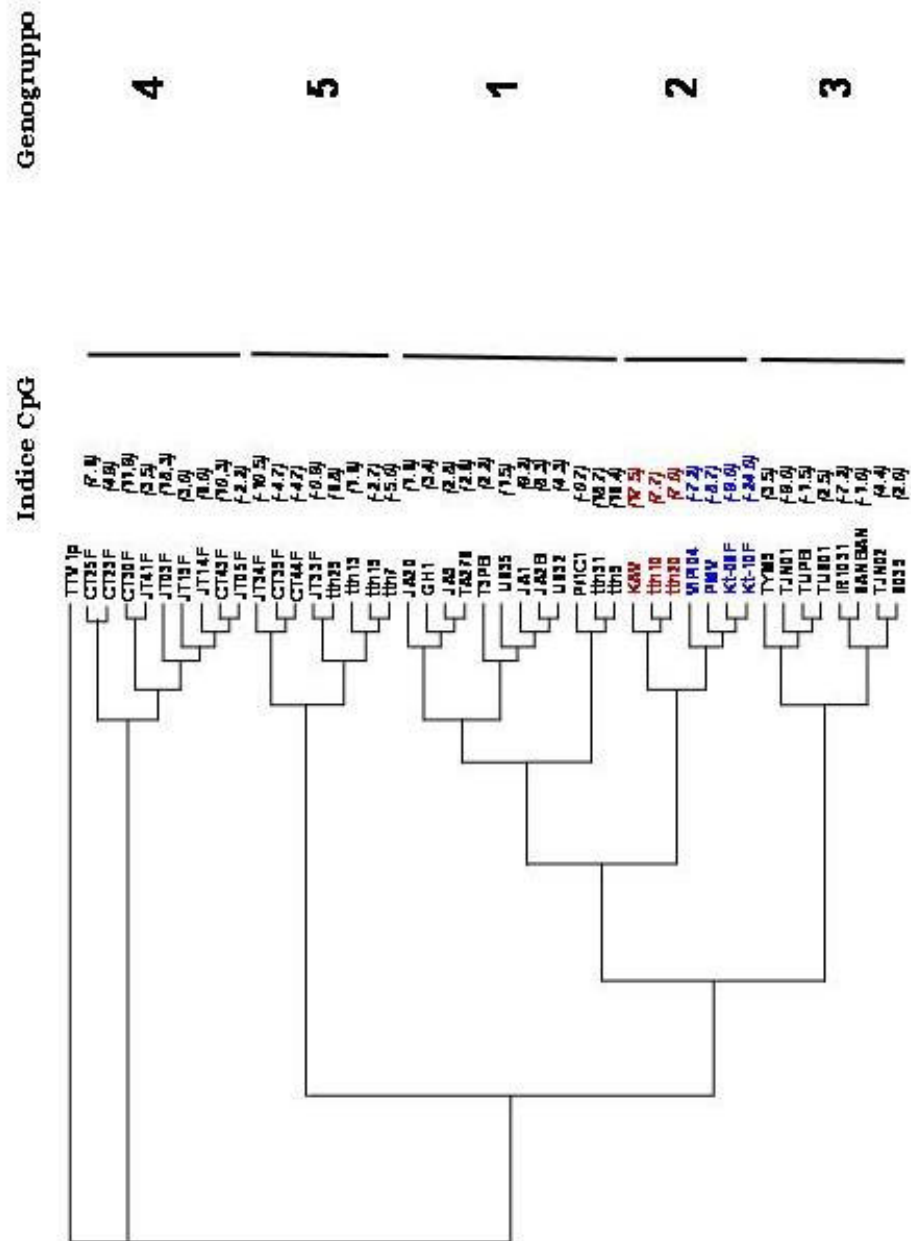


Fig. 13: Confronto tra l'analisi filogenetica e l'indice CpG nei genogruppi di TTV

Genogruppo di TTV	Isolato	Indice CpG	
		Genoma intero	ORF 1
1	P-1C1	-0,7	-3,7
	tth31	18,7	6,09
	tth9	16,4	2,9
	JA1	9,2	7
	JA20	1,6	2,4
	US35	1,5	4,2
2	KAV	17,5	20
	ViPi04	-7,2	3,4
	Kt-10F	-24	-7,9
	Kt08F	-9	-2,4
3	TJN02	4,4	5,8
	IR1031	-7,2	4,5
	TJN01	-9	-2
4	JT03F	18,3	11,2
	CT30F	11,9	2,5
	JT19F	3	1,6
	JT05F	-2,2	-0,9
5	Tth29	6,8	-0,2
	Tth13	1,6	-0,4
	CT44F	-4,7	4,5
	JT33F	-0,9	-1,7
	JT34F	-10,5	-4,3

Tab. 12: Analisi dell'indice CpG nella ORF 1 e nell'intero genoma di alcuni isolati di TTV

Isolamento e caratterizzazione di un isolato di TTV

I risultati ottenuti dall'analisi in silico sulle sequenze degli anellovirus, e in particolare su quelle di TTV, lasciano ipotizzare che diversi virus possano avere una differente capacità immunostimolatoria. Per cercare di comprendere come TTV potrebbe influire sulla funzionalità immunitaria dell'ospite, è stato messo a punto e validato un modello *in vitro* col quale valutare l'effetto del DNA di TTV sull'espressione genica di differenti citochine. Tale modello è costituito da cellule di milza di topo esposte a diverse concentrazioni di DNA di TTV e a differenti agenti stimolatori. Il primo obiettivo di questa fase sperimentale è stato quello di ottenere un genoma completo di TTV da utilizzare come stimolo. A tale proposito, sono state progettate due strategie d'amplificazione specifiche per il genogruppo 4 (come descritto nella sezione materiali e metodi) che hanno consentito di ottenere un primo frammento di 3204 bp e, successivamente, un secondo frammento più piccolo che ha completato l'amplificazione dell'intero genoma. In seguito, sono stati studiati e costruiti altri primer che hanno permesso, mediante la tecnica del *chromosome walking*, di ottenere il completo sequenziamento dei due amplificati ottenuti in precedenza. La

ricostruzione dell'intera sequenza e il suo successivo inserimento in banca dati ha mostrato che l'isolato amplificato (denominato ViPiSal) ha un alto grado di omologia con l'isolato KC-009 (Tabella 13). La sequenza è stata inoltre caratterizzata calcolando i seguenti parametri: contenuto di CpG per kb, ρ CpG, frequenza dei motivi stimolatori e inibitori e valore dell'indice CpG.

Come mostrato in Tabella 14, l'isolato ViPiSal mostrava valori dei suddetti parametri paragonabili alla maggior parte delle sequenze di genogruppo 4 presenti in banca dati.

Sequenze classificate nel gruppo 4	Distanza genetica con la sequenza ViPiSal
CT23F	0,60
CT25F	0,60
CT30F	0,65
CT43F	0,61
JT03F	0,61
JT05F	0,62
JT14F	0,60
JT19F	0,62
JT41F	0,77
KC009	0,85

Tab. 13: Identità genetica dell'isolato ViPiSal rispetto ad alcuni isolati della banca dati

Isolato	Genoma		Odds ratio (%)			indice CpG
	Lunghezza (kb)	N°di CpG per kb	motivi CpG		p CpG	
			p Stimolatori	p Inibitori		
ViPiSal	3,627	53,5	90,5	79,1	72,9	4,4
jt05f	3,688	49,1	66,3	72,2	74,8	-2,2
jt19f	3,676	48,7	88,2	79,9	75,5	3,0
jt41f	3,727	51,5	85,4	76,2	73,1	3,5
ct23f	3,729	53,1	85,3	73,2	75,3	4,9
jt14f	3,626	50,7	90,6	75,9	79,8	6,0
ct25f	3,726	53,1	99,8	81,3	77,2	7,6
ct43f	3,629	49,9	100,5	73,2	75,6	10,3
ct30f	3,570	61,6	103,0	78,5	78,7	11,9
jt03f	3,669	52,3	120,9	77,3	80,3	18,3
Kc-009	3,669	46,1	95,4	74,3	67,0	6,5

Tab. 14: Analisi dell'indice CpG dell'isolato ViPiSal in confronto con le altre sequenze di genogruppo 4 presenti in banca dati.

Studio della cinetica d'espressione delle citochine

Le citochine analizzate sono state di tipo Th-1 (IL-12 e IFN- γ), di tipo regolatorio (IL-6 e IL-10) e di tipo Th-2 (IL-4). Studi preliminari sono stati condotti per determinare la cinetica d'espressione delle diverse citochine e per individuare quale fosse, nel nostro sistema sperimentale, il tempo d'incubazione ottimale fra cellule di milza di topo e stimoli utilizzati. La cinetica delle diverse citochine è stata quindi studiata in questo tipo di cellule incubate con diversi stimoli quali: ODN 1826, la ConA e l'LPS. L'espressione delle citochine è stata valutata a 4, 8, 12 e 24 ore dalla stimolazione. I risultati sono stati espressi come volte d'incremento dell'espressione genica delle interleuchine nelle cellule stimulate rispetto a cellule di controllo non stimulate. Come risulta dalla Tabella 15, le differenti citochine hanno mostrato cinetiche di espressione diverse in relazione allo stimolo utilizzato. In particolare, come già riportato in letteratura (Hartmann et al., 1999) l'uso come stimolo dell'LPS ha indotto un picco d'attivazione della maggior parte delle citochine dopo 4 ore. Al contrario la cinetica delle citochine dopo stimolazione con ConA è apparsa più variabile, con picchi di attivazione dopo 4 ore per IL-6 e IL-12 e dopo 12 ore per IL-10 e l'IFN- γ . Da notare come l'IL-4, l'unico mediatore di classe Th-2 studiato, è stata attivata

Citochina (mRNA)	Max incremento ^a dopo stimolazione con		
	ODN 1826	ConA	LPS
IL-4	2,17 (24) ^b	419,1 (12)	2,7 (8)
IL-6	115,2 (12)	16,6 (4)	20 (4)
IL-10	12,3 (12)	10,5 (12)	13,9 (12)
IL-12	4,5 (12)	1,4 (4)	0,66 (4)
IFN-γ	81,4 (8)	676,4 (12)	202,2 (4)

Tab. 15 : Studio della cinetica d'espressione di alcune citochine

a) L'incremento è espresso come n-volte l'espressione rispetto al non trattato.

b) In parentesi è indicata l'ora del massimo incremento

come atteso dalla sola stimolazione con ConA con un picco a 12 ore. Ancora, la stimolazione con ODN 1826, ha indotto per IL-6, IL-10, IL-12 la massima attivazione dopo 12 ore, mentre il profilo temporale dell'IFN- γ è stato lievemente diverso in quanto il valore d'espressione più elevato è stato osservato dopo 8 ore, anche se una buona attivazione risultava ancora presente dopo 12 ore (Figura 14). Sulla base di questi risultati e visto che l'ODN 1826 contiene nella sua sequenza motivi CpG di tipo stimolatorio che mimano l'effetto del DNA virale, è stato deciso di progettare i successivi esperimenti incubando le cellule con il DNA di TTV per 12 ore, tempo questo corrispondente alla massima attivazione delle citochine di tipo Th-1 dopo stimolazione con ODN 1826.

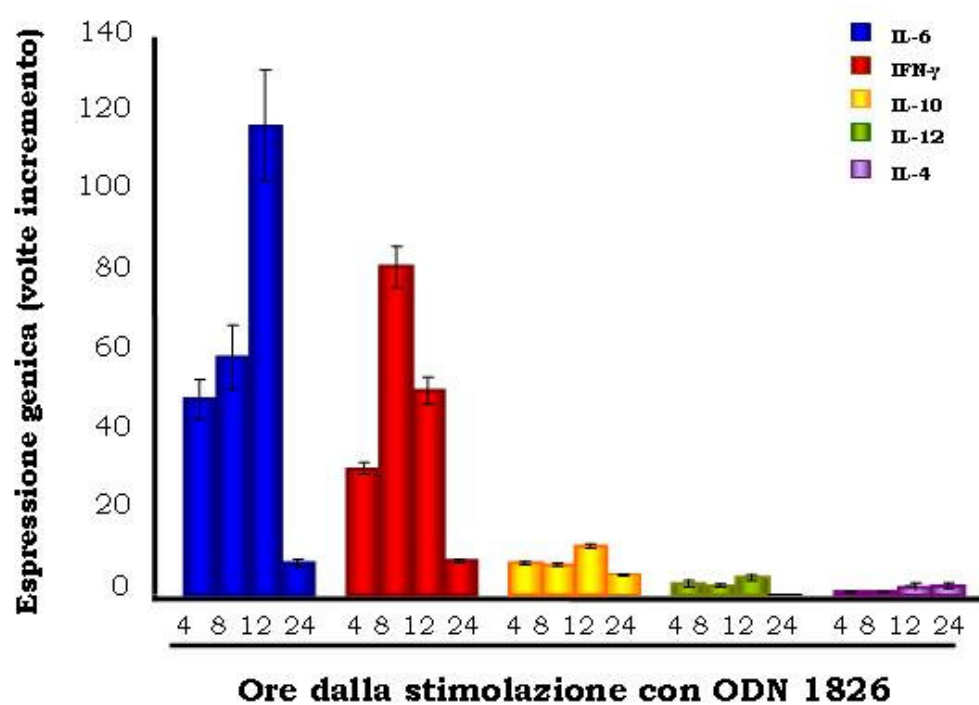


Fig. 14: Cinetica dell'espressione genica delle citochine dopo stimolazione con ODN 1826

Stimolazione di cellule di milza di topo con DNA di TTV

Un primo esperimento è stato progettato per valutare il potenziale effetto modulante del DNA di TTV sull'espressione genica di alcune citochine. In particolare il DNA di TTV a diverse concentrazioni (1, 6, 12 e 24 µg) è stato incubato a 37°C per 12 ore con cellule di milza di topo; il DNA virale utilizzato era costituito da due frammenti genomici di diversa lunghezza e mescolati in modo tale da ottenere concentrazioni equimolari. Come controlli positivi dell'esperimento, sono stati utilizzati l'ODN 1826 e ConA, mentre come controllo negativo è stata utilizzata acqua apirogena. Come risulta dal grafico in Figura 15, il DNA di TTV, a tutte le concentrazioni usate, non ha prodotto una significativa espressione di nessuna delle citochine analizzate. La stimolazione con ODN 1826 ha mostrato invece una significativa attivazione delle citochine di tipo regolatorio (IL-6, IL-10) e dell'IFN- γ , mentre l'espressione dell'IL-12 non è risultata significativamente aumentata. Il fatto che il DNA di TTV non mostrasse alcun effetto stimolatorio, poteva essere dovuto alla sua mancata penetrazione all'interno del compartimento cellulare. Per

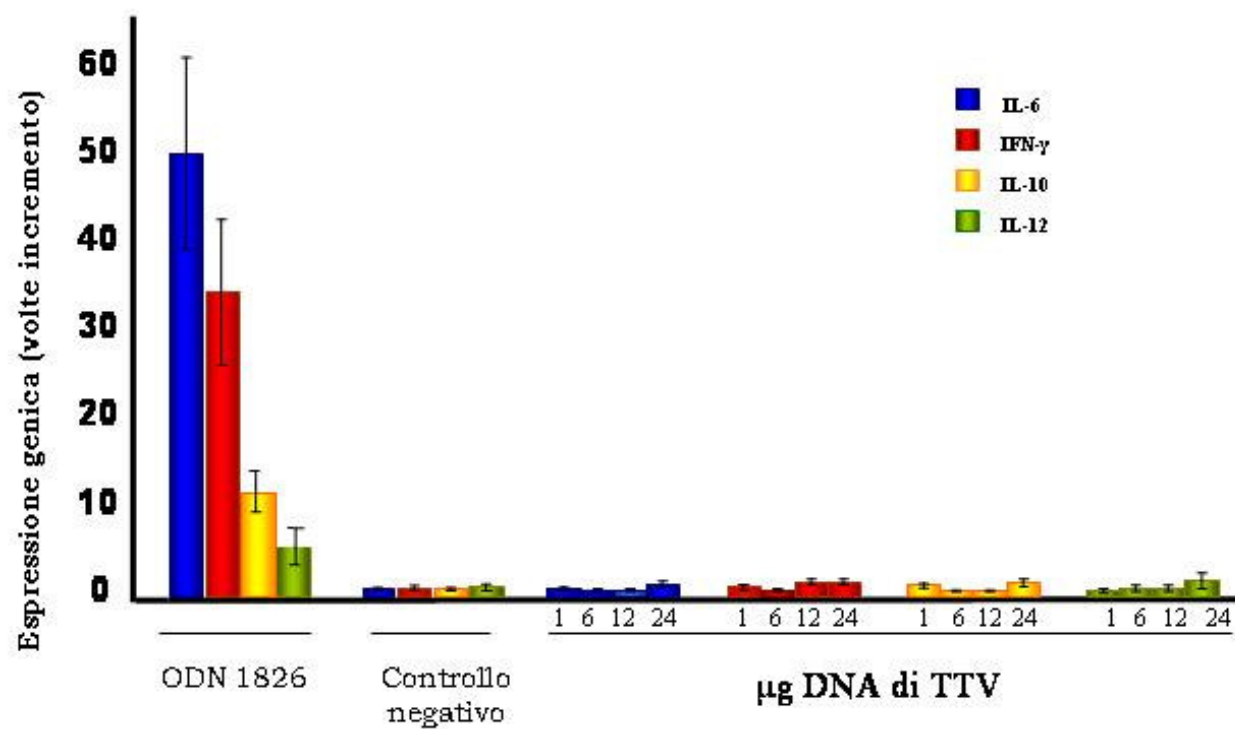


Fig. 15: Espressione genica delle citochine dopo stimolazione con diverse concentrazioni di DNA di TTV.

ovviare a tale problema, il DNA virale e i rispettivi controlli sono stati incubati assieme ad una concentrazione standard di lipofectina. Si è inoltre ritenuto, in base ai risultati precedentemente ottenuti, di analizzare soltanto l'espressione di IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-4. Come illustrato nel grafico in Figura 16, il DNA di TTV ha mostrato, in questo caso, la capacità di indurre un significativo incremento nell'espressione di tutte le citochine di classe Th-1 e regolatorie e tale incremento è risultato essere dipendente dalla concentrazione di DNA virale usata. In particolare, la citochina che ha mostrato un maggiore picco d'espressione è stato l'IFN- γ che è risultato espresso con valori paragonabili a quelli osservati dopo stimolazione con ODN 1826. Al contrario l'IL-4, di classe Th-2, ha mostrato un elevato incremento d'espressione solo dopo la stimolazione con la ConA, ma non con il DNA di TTV o con l'ODN 1826 (Figura 17). Da notare, inoltre, come la stimolazione delle cellule con la sola lipofectina non abbia indotto incrementi significativi nell'espressione di nessuna citochina.

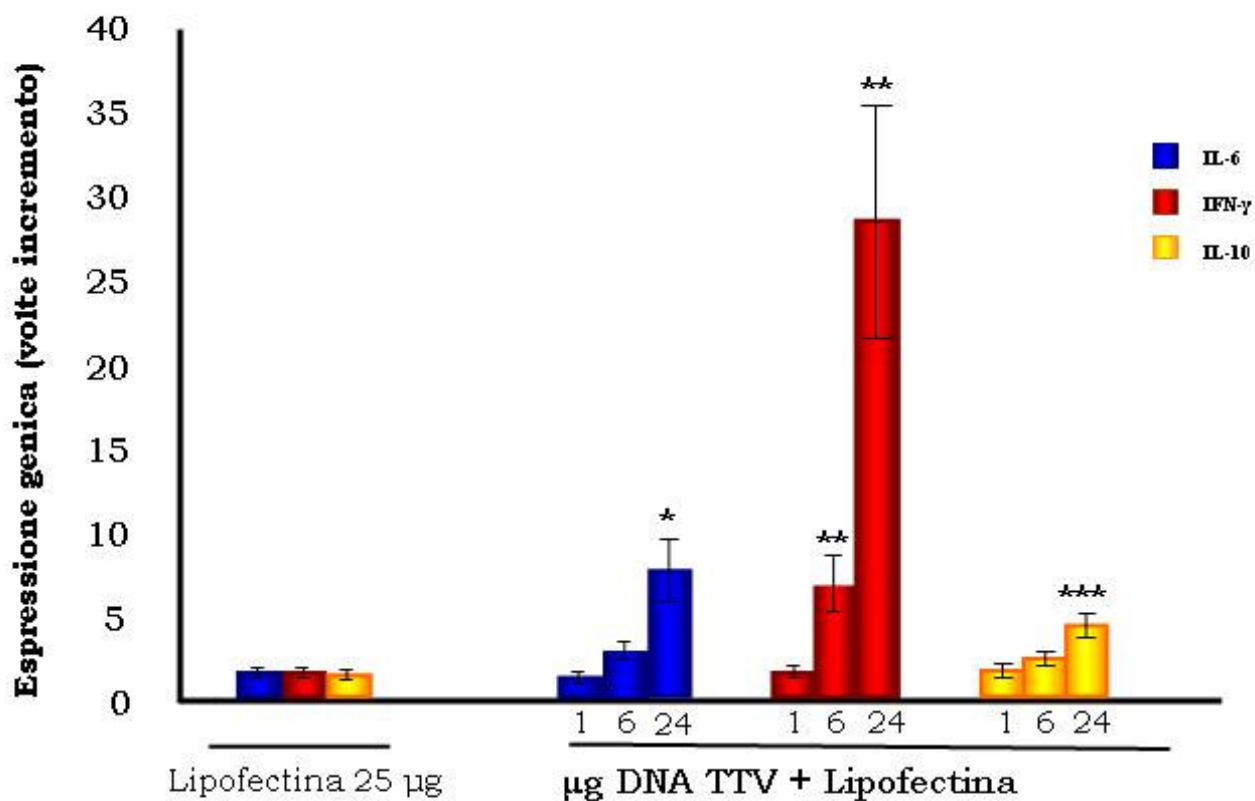


Fig. 16: Espressione genica delle citochine dopo stimolazione con diversi microgrammi di DNA di TTV e lipofectina.

*, **, ***, statisticamente significativo rispetto alla stimolazione con lipofectina rispettivamente con $p=0.005$; $p=0.006$, $p=0.001$, $p=0.001$

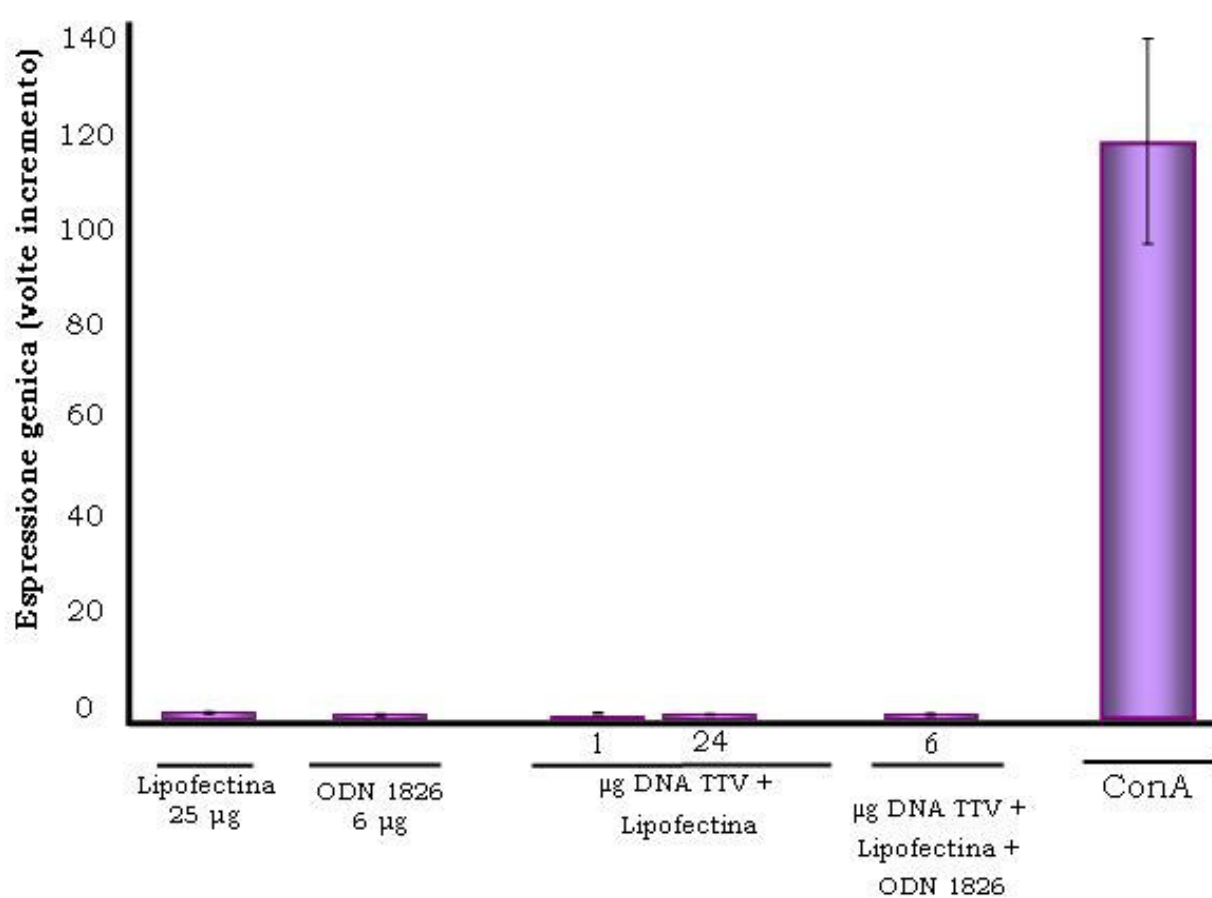


Fig. 17 : Espressione genica dell' IL-4

Co-stimolazione delle cellule di milza di topo con DNA di TTV e ODN 1826.

I risultati ottenuti nei precedenti esperimenti hanno suggerito che il DNA dell'isolato di TTV preso in esame, coniugato con lipofectina, potrebbe avere un potenziale ruolo immunomodulante, spingendo il sistema immunitario verso una risposta di tipo Th-1. E' stato quindi interessante valutare, in esperimenti successivi, la potenziale capacità del DNA virale di modulare l'azione dell'ODN 1826, che da solo risulta essere un potente attivatore delle interleuchine di classe Th-1. A tale scopo le cellule sono state stimulate con:

a) ODN 1826 assieme a due differenti concentrazioni di DNA virale (1 µg e 24 µg); b) ODN 1826 da solo; c) ODN 1826 di controllo che presenta la sequenza GpC invece di quella stimolatoria CpG. Le citochine valutate sono state l'IFN-γ, l'IL-6, l'IL-10 e l'IL-4. Come riportato in Figura 18, il DNA di TTV in combinazione con l'ODN 1826 ha indotto nelle cellule un'espressione genica delle citochine più spiccata rispetto a quella indotta dalla stimolazione con il solo ODN 1826. Tali differenze sono risultate statisticamente significative alla concentrazione di DNA di TTV pari a 24 µg. Ancora una volta, l'IL-4 non ha subito alcun aumento d'espressione (Figura 17).

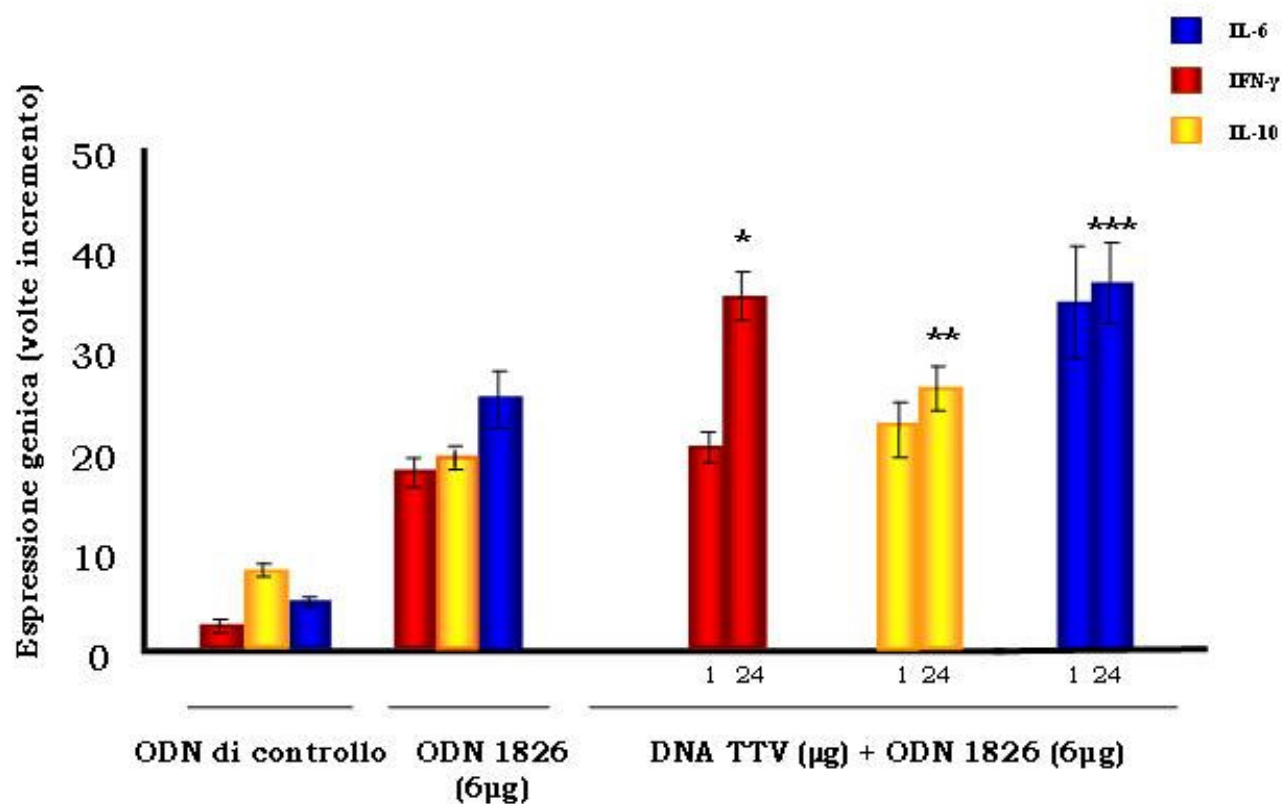


Fig. 18: Espressione genica delle citochine dopo stimolazione con DNA di TTV e ODN 1826

*, **, ***, statisticamente significativi rispetto alla stimolazione con il solo ODN 1826 rispettivamente con $p=0,0001$; $p=0,03$; $p=0,03$

I risultati di questi esperimenti suggeriscono che il DNA del TTV studiato è in grado di agire sinergicamente con un altro induttore di citochine potenziandone l'azione. Tale effetto risulta ancora più evidente quando alla quantità di 6 µg di TTV DNA è associata la lipofectina. Come risulta evidente dal grafico in Figura 19, l'associazione lipofectina-TTV DNA determina un significativo aumento nei valori d'espressione delle citochine potenziando l'effetto dell'ODN 1826. E' interessante inoltre notare che, anche in questo esperimento, la citochina che ha mostrato la maggiore attivazione è stato l'IFN- γ , confermando la capacità del DNA del TTV studiato di spingere verso una risposta immunitaria di tipo Th-1.

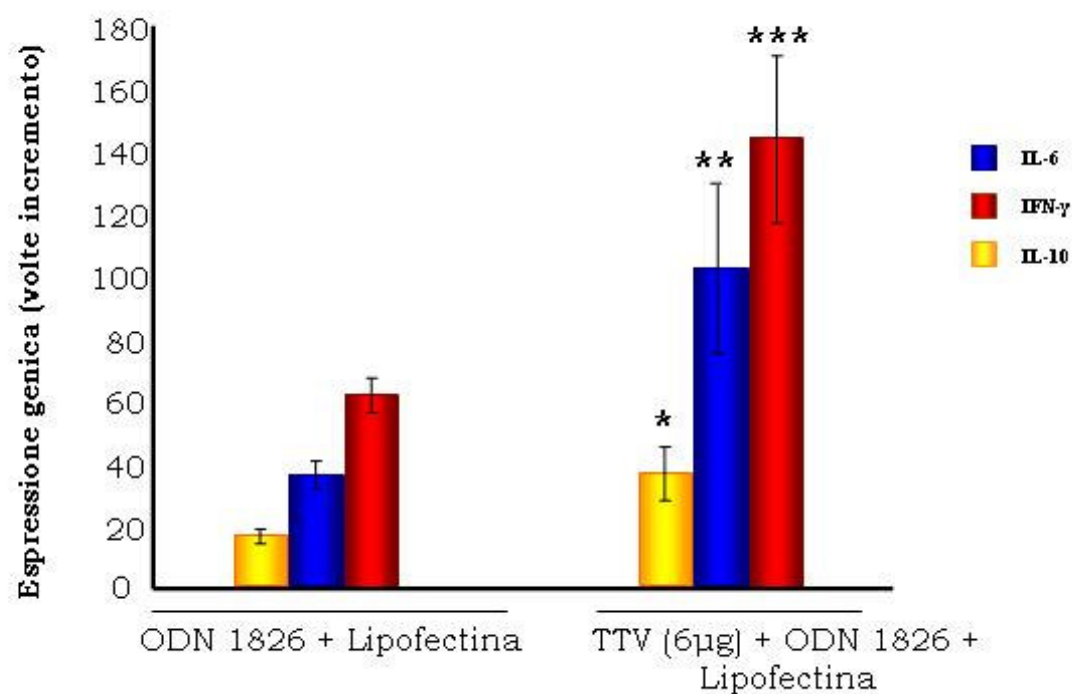


Fig 19: Espressione genica delle citochine dopo stimolazione con il DNA di TTV in combinazione con l'ODN 1826 e lipofectina rispetto al controllo.

*, **, *** statisticamente significativo rispetto alla stimolazione con ODN 1826 e lipofectina rispettivamente con $p=0,03$; $p=0,01$; $p=0,05$

Interazioni del DNA virale con il recettore

Un altro obiettivo di questo studio è stato quello di comprendere se l'incremento di espressione delle citochine, osservato dopo la tranfezione delle cellule di milza di topo con il DNA di TTV, fosse mediato dal recettore TLR9. A tal fine sono stati progettati esperimenti in cui il DNA virale e i rispettivi controlli sono stati incubati in presenza o in assenza di cloroquina. Tale farmaco, molecola notoriamente utilizzata come antimalarico, ha la proprietà di inibire l'acidificazione dell'endosoma, condizione necessaria perché avvenga l'attivazione del TLR9. Il blocco del recettore TLR9 porta, quindi, ad una inibizione dell'espressione genica. Come fase preliminare, è stato necessario condurre delle prove sulla possibile tossicità cellulare esercitata dalla cloroquina, allo scopo di determinare la dose efficace ma non tossica (cioè, la concentrazione che provoca una percentuale di morte cellulare inferiore al 50%). La vitalità delle cellule di milza di topo, esposte a diverse concentrazioni di cloroquina, è stata valutata mediante saggio di esclusione con Trypan-blue e la concentrazione massima non tossica è risultata essere pari a 10 μ M. Questi dati hanno permesso di progettare il successivo esperimento, nel quale sono stati incubati insieme alle cellule della milza di topo singolarmente o in combinazione con la

cloroquina: 24 µg di TTV-DNA, 6 µg di ODN 1826 e 5 µg/ml di ConA. Dopo 12 ore è stata valutata l'espressione dell'IFN-γ, la citochina che maggiormente veniva attivata nei precedenti esperimenti. Come possiamo notare dal grafico in Figura 20, il trattamento con cloroquina annulla l'espressione citochinica indotta sia dal TTV-DNA sia dall'ODN 1826 e al contrario, non provoca una significativa riduzione nei livelli di espressione indotti dalla ConA. Questi dati suggeriscono che il recettore coinvolto nell'attivazione citochinica operata dal TTV-DNA sia il TLR9; infatti, il blocco selettivo di tale recettore da parte della cloroquina porta ad un annullamento dell'espressione dell'IFN-γ indotto dal TTV-DNA e dall'ODN 1826 ma non altera l'induzione indotta da altri stimoli come la ConA, che utilizza per la trasduzione del segnale altri recettori.

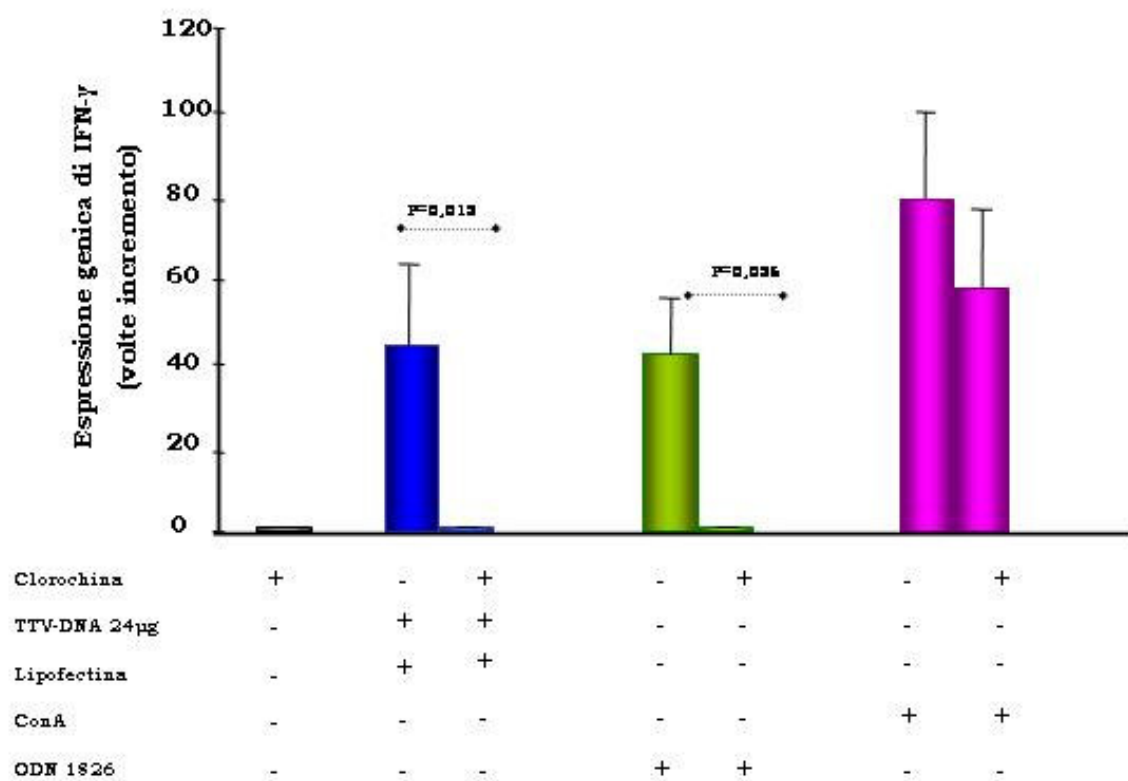


Fig. 20: Espressione genica di IFN- γ

Gli anellovirus dell'uomo sono un vasto ed eterogeneo gruppo di virus caratterizzati da alcune peculiarità: un'elevata diffusione nella popolazione generale, un'ampia oscillazione dei titoli virali, una prolungata e/o un' indefinita persistenza nell'ospite, un ampio tropismo tissutale ed una elevata eterogeneità genetica, straordinaria per un virus a DNA. Dal 1997, anno in cui fu scoperto il primo isolato di TTV, il prototipo degli anellovirus, sono stati condotti numerosi studi per investigare il ruolo patogenetico di questi virus e, sebbene siano state formulate diverse ipotesi, nessuna è stata definitivamente confermata.

Da alcuni studi è emersa la presenza di titoli particolarmente elevati di TTV in soggetti con infezione da HIV e in pazienti con varie patologie. Christensen e collaboratori (2000) hanno rilevato livelli di TTV nel sangue più alti nei pazienti HIV positivi rispetto alla popolazione sana di controllo. E questo elevato carico del virus è risultato essere un parametro predittivo di minore probabilità di sopravvivenza, al pari di altri fattori come il titolo virale di HIV, la conta dei CD4+ e l'età del paziente.

Maggi e collaboratori (2003a) hanno evidenziato che in bambini con broncopolmonite circolavano titoli di TTV più elevati rispetto a bambini con patologie respiratorie più lievi. Inoltre,

tra i bambini con broncopolmonite, coloro che presentavano coinfezioni con altri virus respiratori, mostravano un titolo di TTV più alto rispetto a quelli infettati dal solo TTV.

Questi studi, pur non dimostrando con certezza che TTV sia l'agente causale della patologia osservata, hanno suggerito un suo probabile ruolo nell'aggravare la malattia respiratoria. Un altro aspetto interessante, sicuramente ancora da studiare approfonditamente, riguarda le interazioni esistenti tra anellovirus, in particolare TTV, e il sistema immunitario dell'ospite. Attualmente, sono poche le informazioni presenti in letteratura riguardo a questo aspetto. Tuttavia, appare ormai ben dimostrato che TTV non solo è in grado di penetrare nelle cellule del sistema immunitario ma è anche capace di replicare al loro interno. Infatti markers di replicazione del virus (DNA a doppio filamento, mRNA) sono stati ritrovati nel midollo osseo (Okamoto et al., 2000b) e in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate. Al contrario, TTV non replica in cellule linfoidi che si trovano in fase stazionaria (Maggi et al., 2001b). Quest'ultimo aspetto suggerisce che l'interazione fra TTV e il sistema immunitario possa rappresentare una tappa fondamentale nella patogenesi del virus. A conferma di questa ipotesi, Maggi e collaboratori hanno condotto uno studio su bambini di età inferiore ai due anni con patologie respiratorie di

varia gravità ed hanno osservato una correlazione inversa tra i titoli di TTV e la percentuale di linfociti T totali e/o di linfociti T CD4+, ed al contrario una correlazione diretta con il numero di linfociti B circolanti (Maggi et al., 2003b).

Questo studio di tesi propone un nuovo modo con cui investigare la relazione tra infezione virale e sistema immunitario dell'ospite, in particolare cercando di valutare le interazioni tra genoma virale (con riferimento al suo contenuto in motivi CpG) e produzione di mediatori immunologici nell'ospite (interleuchine e citochine). Per poter realizzare tale obiettivo il lavoro è stato articolato in due parti principali. La prima parte è stata dedicata allo studio *in silico* delle sequenze dei genomi completi degli anellovirus e nell'ambito di tale analisi, sono stati valutati diversi parametri tra cui quello più importante il contenuto in dinucleotidi CpG. Nella seconda parte, è stato messo a punto un modello sperimentale *in vitro* con cui valutare l'effetto del DNA di TTV sull'espressione genica di differenti citochine. Il lavoro *in silico* è stato condotto analizzando un totale di 60 sequenze presenti in banca dati al marzo 2007 e rappresentative di genomi completi di anellovirus. L'analisi si è basata sull'esame di diversi parametri, tra cui uno dei più importanti è stato il p_{CpG} , che rappresenta il rapporto tra la frequenza del dinucleotide CG

diviso il prodotto della frequenza del nucleotide C per la frequenza del nucleotide G. Tale parametro permette di valutare, secondo quanto proposto da Karlin e collaboratori (1994) se una data sequenza di DNA ha un alto o un basso contenuto di motivi CpG rispetto a quanto atteso da una presenza random di tale dinucleotide. L'analisi ha evidenziato che gli anellovirus hanno un ridotto contenuto di motivi CpG e ciò risulta particolarmente vero per gli isolati di TTMV, TTMDV e SAV. Questo risultato è in linea con quanto osservato per altri virus con genomi di lunghezza inferiore a 30 kb. Karlin e collaboratori hanno infatti dimostrato, analizzando più di 75 sequenze genomiche complete appartenenti a isolati virali di lunghezza inferiore a 30 kb, che il contenuto in dinucleotide CpG è estremamente basso con l'unica eccezione rappresentata da alcuni isolati appartenenti ai togavirus (Karlin et al., 1994). Tale ridotto contenuto potrebbe essere legato al mantenimento di importanti meccanismi morfogenetici e/o funzionali che avverrebbero in maniera ottimale quando è mantenuta una bassa frequenza del dinucleotide CpG. E' infatti dimostrato che, tra tutti i dinucleotidi, il CpG possiede l'energia termodinamica di impilamento (stacking energy) più alta (Breslauer et al., 1986) e che la riduzione di tale nucleotide, con conseguente diminuzione dell'energia di impilamento, potrebbe aumentare il

tasso di trascrizione e di replicazione del DNA virale a causa di una maggiore facilità di separazione dei filamenti genomici. E' interessante notare come, dall'analisi delle sequenze di TTV nell' UTR e nella regione codificante, si evidenzi un differente contenuto in CpG nelle due porzioni genomiche. Infatti, la regione codificante presenta una notevole riduzione dei motivi CpG rispetto all'UTR. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato, come osserva Karlin et al.(1994), ipotizzando che i motivi CpG siano punti genomici ad elevata frequenza di mutazioni con potenziali deleterie conseguenze funzionali e/o strutturali per il virus. In tale ottica, una riduzione dei motivi CpG nella porzione codificante del genoma potrebbe portare notevoli vantaggi al virus. Un altro interessante parametro che è stato valutato è la frequenza di motivi immunostimolatori e di motivi inibitori. Infatti la scoperta di motivi CpG immunostimolatori nel DNA batterico ha permesso di poter considerare la molecola del DNA non solo come molecola trasportatrice di informazioni genetiche, ma anche come elemento coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale. Da questa tesi è emerso che negli isolati di TTV, TTMV e TTMDV la frequenza degli esameri stimolatori è paragonabile a quella degli esameri inibitori mentre negli isolati di SAV si osserva una maggiore prevalenza di motivi inibitori. Da questa

prima analisi potremmo ipotizzare che gli isolati di SAV, almeno quelli attualmente conosciuti, possono avere un effetto immunoneutralizzante più marcato rispetto agli altri anellovirus. Un'analisi ancora più approfondita condotta fra i genogruppi di TTV ha evidenziato differenze nel contenuto di motivi immunostimolatori e in particolare che il gruppo 4 ha mostrato una frequenza di tali motivi più alta rispetto agli altri genogruppi del virus. A completamento dell'analisi in silico è stato calcolato per tutte le sequenze genomiche l'indice CpG formulato da Lunderberg et al., (2003). Tale indice permette di comparare il potenziale immunostimolatorio fra diverse sequenze virali indipendentemente dalla loro lunghezza, dal loro contenuto totale di CG e della loro relativa frequenza di motivi stimolatori neutralizzanti. Questa analisi ha evidenziato che tra i vari isolati degli anellovirus esiste un'elevata variabilità dell'indice CpG, suggerendo la possibilità che essi possano esercitare una diversa attività immunostimolatoria. Inoltre, analizzando le sequenze appartenenti ai diversi genogruppi di TTV, si evidenziano differenti valori dell'indice CpG non solo tra i diversi gruppi ma anche all'interno dello stesso genogruppo. Tale variabilità rispecchia l'elevata eterogeneità genetica di questi virus, suggerendo che ogni singolo isolato potrebbe avere differenti effetti sul sistema

immunitario dell'ospite. In particolare questo studio ha predetto un maggiore potenziale immunostimolatorio per gli isolati appartenenti ai genogruppi 1 e 4, ed un potenziale immunoneutralizzante per sequenze di genogruppo 5. Più difficile la valutazione degli isolati di gruppo 2 e 3: presentando indici di CpG vari e diversi anche all'interno dello stesso gruppo, essi sembrano infatti poter avere effetti variabili, se non contrastanti, sul sistema immunitario.

La seconda parte di questo studio si è focalizzata sulla messa a punto di un modello *in vitro* che fosse capace, mediante l'analisi dell'espressione di determinate citochine, di valutare l'effetto del DNA di TTV sul sistema immunitario. In questo modello sperimentale il sistema target dell'effetto del DNA era costituito da cellule di milza di topo; tali cellule infatti sono ampiamente utilizzate per questo scopo e si rivelano particolarmente adatte per la quantificazione delle citochine prodotte. Cellule di milza di topo sono state quindi esposte a vari agenti immunostimolatori fra cui: l'ODN 1826, la ConA e l'LPS oltre, naturalmente, al DNA di TTV in varie concentrazioni e combinazioni. Il DNA virale utilizzato in questo studio appartiene ad un isolato di genogruppo 4 di TTV ed è stato amplificato dal plasma di una paziente affetta da artrite reumatoide. I risultati ottenuti dalla caratterizzazione in silico

della completa sequenza dell'isolato hanno mostrato valori dell'indice CpG paragonabili a quelli forniti dalla precedente analisi effettuata sulle sequenze di gruppo 4 presenti in banca dati, confermando anche per questo isolato un valore dell'indice CpG positivo. La scelta delle citochine da analizzare si è basata sui dati forniti dalla letteratura che dimostrano come gli ODN o i motivi CpG di tipo stimolatorio, frequenti nel genoma di batteri e virus, siano in grado di indurre le cellule di milza di topo a produrre IL-12, IL-6, IL-10 e IFN- γ (Krieg et al., 1998). Al contrario, gli stessi stimoli, non inducono la produzione di IL-4 (Klinman et al., 1996). Le tempistiche utilizzate per valutare l'espressione genica delle citochine nei diversi esperimenti sono state decise dopo un preliminare ed accurato studio sulla loro cinetica d'espressione. Infatti, in accordo con dati riportati in letteratura, le citochine hanno mostrato cinetiche di attivazione differenti in relazione allo stimolo utilizzato. In particolare, la stimolazione di cellule di milza di topo con LPS ha indotto il picco d'attivazione citochinico dopo 4 ore d'incubazione (Hartman et al., 1999). Al contrario, la stimolazione con ODN1826, che grazie alla presenza nella sua sequenza di motivi stimolatori mimica il DNA batterico e virale, ha indotto la massima attivazione dopo 12 ore d'incubazione. Questi risultati hanno consentito di progettare la giusta tempistica dei

successivi esperimenti, stabilendo il tempo d'incubazione a 12 ore.

I successivi esperimenti sono stati progettati per comprendere se il DNA di TTV fosse in grado di indurre la produzione di citochine pro-infiammatorie e/o regolatorie e per indagare se la concentrazione di DNA virale potesse influenzare tale processo. A tale scopo le cellule di milza di topo, sono state incubate, oltre che con stimoli di controllo, anche con diverse concentrazioni di DNA virale. I risultati hanno mostrato che l'ODN 1826, utilizzato come controllo positivo, ha indotto una significativa espressione di tutte le citochine di classe Th-1 e regolatorie, mentre, come atteso, la citochina di classe Th-2 è stata attivata solo dalla stimolazione con ConA. Il DNA di TTV usato come tale non ha invece prodotto una significativa espressione di nessuna delle citochine analizzate. Una possibile spiegazione di tale risultato poteva essere l'incapacità da parte del DNA virale di giungere integro nel compartimento intracellulare. Infatti i legami fosforodiesteri, presenti nel DNA, possono essere facilmente idrolizzati dalle nucleasi cellulari, mentre i legami fosforotioati, presenti nell'ODN 1826, conferiscono protezione verso tali enzimi. A conferma di ciò, l'utilizzo della lipofectina per transfettare il DNA di TTV all'interno delle cellule ha modificato i risultati del precedente

esperimento. Infatti, i complessi lipofectina-DNA di TTV hanno indotto incrementi statisticamente significativi dell'espressione delle citochine analizzate, con particolare riferimento all'IL6 e IFN- γ . Questi risultati sono in accordo con quanto osservato da Wilkström studiando il circovirus porcino di tipo 2 (PCV-2). In tale studio, affinché inducesse un incremento di IFN- α , il DNA del PCV-2 doveva essere incubato con lipofectina che probabilmente agiva proteggendolo dalla degradazione e dirigendolo più facilmente verso il compartimento endosomiale dove avviene l'interazione con il recettore TLR9 (Wilkström et al., 2007). Il nostro studio ha poi mostrato come l'incremento d'espressione delle citochine sia risultato dipendente dalla quantità di DNA utilizzata, facendo ipotizzare nell'infezione naturale un ruolo fondamentale della carica virale. Altri risultati interessanti sono emersi transfettando le cellule con il DNA di TTV insieme all'ODN 1826. In questo caso l'aggiunta del DNA virale, anche senza la lipofectina, è stata in grado di incrementare significativamente l'espressione delle citochine di classe Th-1 e regolatorie indotte dall'ODN 1826. Questa apparente contraddizione, ossia l'effetto del DNA di TTV anche in assenza di lipofectina, potrebbe essere spiegata supponendo che, anche se la quantità di DNA virale integro che raggiunge il compartimento intracellulare è ridotta a causa dell'azione delle

nucleasi cellulari, è in questo caso tuttavia sufficiente a potenziare l'espressione genica poiché agisce amplificando un segnale già innescato da un potente attivatore d'espressione come l'ODN 1826. In quest'ottica, tali risultati assumono una notevole importanza in quanto, come accade per i circovirus animali, anche TTV potrebbe essere considerato un cofattore importante nella patogenesi di numerose patologie in cui si verifica una abnorme risposta immunitaria di tipo Th-1. Quest'ipotesi può forse assumere particolare rilievo sapendo che il DNA virale preso in esame è stato isolato e amplificato da un soggetto affetto da artrite reumatoide, patologia autoimmune nella quale si assiste proprio ad una anomala risposta immunitaria di tipo Th-1. Ciò anche in considerazione del fatto che questo gruppo di TTV è risultato particolarmente prevalente nei pazienti affetti da questa malattia (Maggi et al. 2007).

Un altro interessante aspetto studiato riguarda il meccanismo attraverso il quale il DNA di TTV, in combinazione con il liposoma o con l'ODN 1826, determina un aumento di espressione di alcune citochine di classe Th-1. In particolare è stato studiato il coinvolgimento del recettore TLR9 nella cascata di attivazione d'espressione genica. Gli esperimenti condotti su cellule murine nelle quali è stato operato un blocco selettivo del

TLR9 mediante cloroquina dimostrano che, con alta probabilità il recettore coinvolto nell'attivazione della risposta Th-1 è proprio il TLR9. Infatti, da tali esperimenti risulta un netto calo dell'espressione dell'IFN- γ nelle cellule di milza di topo trattate con cloroquina e contemporaneamente stimulate con il DNA di TTV o con ODN1826. A conferma di ciò, l'inalterato livello di espressione mantenuto dalla stimolazione con ConA dopo trattamento con cloroquina garantisce che il farmaco abbia selettivamente bloccato il recettore TLR9 e non altri tipi di recettori. Infatti come osservato da Lee e collaboratori (2003) la cloroquina è in grado di bloccare l'attivazione del TLR9 con valori superiori al 90% mentre inibisce solo parzialmente il TLR7 e non ha effetto sull'attivazione del TLR8 e TLR2. E' inoltre, da escludere che tale riduzione sia dovuta ad un effetto tossico da parte della cloroquina poiché la concentrazione utilizzata è stata esaminata preliminarmente in prove di tossicità.

In conclusione, i risultati di questo lavoro di tesi hanno evidenziato alcuni aspetti nuovi ed interessanti del rapporto tra gli anellovirus e il sistema immunitario dell'ospite. In particolare, è stata proposta una nuova caratterizzazione genomica di questi virus in base alla quale è ipotizzabile una diversa interazione dei differenti isolati di TTV con il sistema

immunitario. Inoltre, la messa a punto di un sistema sperimentale *in vitro*, ha permesso di dimostrare come il DNA di TTV, almeno quello dell'isolato utilizzato nel sistema, è stato in grado di indurre il sistema immunitario verso la produzione di citochine di classe Th-1. Rimangono tuttavia da chiarire alcuni aspetti fondamentali, tra cui uno dei più importanti riguarda l'effetto prodotto da isolati appartenenti a diversi genogruppi di TTV. Appare, infatti, plausibile che l'elevata eterogeneità genetica di TTV possa riflettersi in una differente capacità, dei diversi isolati, di interazione con il sistema immunitario dell'ospite.

Akira, S. and Hemmi H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* **85**, 85-95.

Ali, S., Fevery, J., Peerlinck, K., Verslype, C., Schelstraete, R., Gyselinck, F., Emonds, M. P., Vermynen, J. and Yap, S. H. (2002). TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *J Med Virol* **66**, 561-6.

Asabe, S., Nishizawa, T., Iwanari, H. and Okamoto, H. (2001). Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 298-304.

Ball, J. K., Curran, R., Berridge, S., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Thomson, B. J., Irving, W. L. and Sharp, P. M. (1999). TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* **80** 1759-68.

Bando, M., Ohno, S., Oshikawa, K., Takahashi, M., Okamoto, H. and Sugiyama, Y. (2001). Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **95**, 935-42.

Bendinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G. and Vatteroni, M. L. (2001). Molecular properties, biology, and

clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* **14**, 98-113.

Berg, T., Schreier, E., Heuft, H. G., Hohne, M., Bechstein, W. O., Leder, K., Hopf, U., Neuhaus, P. and Wiedenmann, B. (1999). Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. *J Med Virol* **59**, 117-21.

Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., de Micco, P. and de Lamballerie, X. (1999). Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *J Gen Virol* **80**, 419-24.

Biagini, P., Gallian, P., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., Zapitelli, J. P., de Lamballerie, X. and de Micco, P. (2000). High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems. *Transfusion* **40**, 590-5.

Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Touinssi, M., de Micco, P. and de Lamballerie, X. (2001a). Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. *J Clin Virol* **22**, 91-9.

Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Touinssi, M., Cantaloube, J., de Micco, P. and de Lamballerie, X. (2001b). Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of

TT virus-like mini virus human isolates. *J Gen Virol* **82**, 379-83.

Boysen, T., Christensen, J. K., Madsen, C. D., Eugen-Olsen, J., Christensen, L. S., Moller-Sorensen, H., Weber, A., Ladefoged, S. D. and Krogsgaard, K. (2003). Presence and significance of TT virus in Danish patients on maintenance hemodialysis. *Scand J Urol Nephrol* **37**, 259-64.

Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blöcker and L. A. Marky. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 1358-62.

Cacoub, P., Rosenthal, E., Gerolami, V., Hausfater, P., Ghillani, P., Sterkers, Y., Thibault, V., Khiri, H., Piette, J. C. and Halfon, P. (2003). Transfusion-associated TT virus co-infection in patients with hepatitis C virus is associated with type II mixed cryoglobulinemia but not with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Microbiol Infect* **9**, 39-44.

Chace, J.H., N.A. Hooker, K.L. Mildenstrein, A.M. Krieg and J.S. Cowdery. (1997). Bacterial DNA-induced NK cell IFN- γ production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **84**, 185-193.

Chan, P. K., Chik, K. W., Li, C. K., Tang, N. L., Ming, M. S., Cheung, J. L., Ng, K. C., Yuen, P. M. and Cheng, A. F. (2001). Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *J Viral Hepat* **8**, 304-9.

Chen, B. P., Rumi, M. G., Colombo, M., Lin, Y. H., Ramaswamy, L., Luna, J., Liu, J. K., Prati, D. and Mannucci, P. M. (1999). TT virus is present in a high frequency of Italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates. *Blood* **94**, 4333-6.

Christensen, J. K., Eugen-Olsen, J., M, S. L., Ullum, H., Gjedde, S. B., Pedersen, B. K., Nielsen, J. O. and Krogsgaard, K. (2000). Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **181**, 1796-9.

Cleavinger, P. J., Persing, D. H., Li, H., Moore, S. B., Charlton, M. R., Sievers, C., Therneau, T. M. and Zein, N. N. (2000). Prevalence of TT virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers. *Am J Gastroenterol* **95**, 772-6.

Colombatto, P., Brunetto, M. R., Kansopon, J., Oliveri, F., Maina, A., Aragon, U., Bortoli, M. L., Scatena, F., Baicchi, U., Houghton, M., Bonino, F. and Weiner, A. J. (1999). High prevalence of G1 and G2 TT-virus infection in subjects with high and low blood exposure risk: identification of G4 isolates in Italy. *J Hepatol* **31**, 990-6.

Comar, M., Ansaldi, F., Morandi, L., Dal Molin, G., Foschini, P. M., Croce, S. L., Bonin, S., Stanta, G., Tiribelli, C. and Campello, C. (2002). In situ polymerase chain reaction detection of transfusion-transmitted virus in liver biopsy. *J Viral Hepat* **9**, 123-7.

Davidson, F., MacDonald, D., Mokili, J. L., Prescott, L. E., Graham, S. and Simmonds, P. (1999). Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis* **179**, 1070-6.

Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M. and Akahane, Y. (2000). Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J Med Virol* **62**, 531-7.

Devalle, S. and Niel, C. (2004). Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1 infected patients. *J Med Virol* **72**, 133-73.

. Erker, J. C., Leary, T. P., Desai, S. M., Chalmers, M. L. and Mushahwar, I. K. (1999). Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol* **80**, 1743-50.

Fields, N. (1996). Virology, p 2950. In Fields N., Kinpe D. M., Howley P. M., Chanok M. R., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E., Fields Virology 3rd d.-1996. *Lippincot-Raven, Philadelphia*.

Fornai, C., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Pistello, M. and Bendinelli, M. (2001). High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol* **39**, 2022-4.

Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S. U., Purcell, R. H. and Bukh, J. (1999). High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J Med Virol* **59**, 313-7.

Fujiwara, T., Iwata, A., Iizuka, H., Tanaka, T. and Okamoto, H. (1998). Transfusion transmitted virus. *Lancet* **352**, 1310-1.

Gad, A., Tanaka, E., Orii, K., Kafumi, T., Serwah, A. E., El-Sherif, A., Nooman, Z. and Kiyosawa, K. (2000). Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic liver disease and volunteer blood donors in Egypt. *J Med Virol* **60**, 177-81.

Gallian, P., Berland, Y., Olmer, M., Raccach, D., de Micco, P., Biagini, P., Simon, S., Bouchouareb, D., Mourey, C., Roubicek, C., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., Dussol, B. and de Lamballerie, X. (1999). TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J Clin Microbiol* **37**, 2538-42.

Gallian, P., Biagini, P., Zhong, S., Touinssi, M., Yeo, W., Cantaloube, J. F., Attoui, H., de Micco, P., Johnson, P. J. and de Lamballerie, X. (2000). TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol* **17**, 43-9.

Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Dussol, B., Berland, Y., de Micco, P. and de Lamballerie, X. (2002).

High genetic diversity revealed by the study of TLMV infection in French hemodialysis patients. *J Med Virol* **67**, 630-5.

Gerner, P., Oettinger, R., Gerner, W., Falbrede, J. and Wirth, S. (2000). Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J* **19**, 1074-7.

Gibbs, M. J. and Weiller, G. F. (1999). Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8022-7.

Gimenez-Barcons, M. and JC. Saiz (1999). The TT virus another accidental tourist? *Gastroenterol Hepatol* **22**, 154-6.

Griffiths, P. (1999). Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev Med Virol* **9**, 73-4.

Hallett, R. L., Clewley, J. P., Bobet, F., McKiernan, P. J. and Teo, C. G. (2000). Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J Gen Virol* **81**, 2273-9.

Handa, A., Dickstein, B., Young, N. S. and Brown, K. E. (2000). Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* **40**, 245-51.

He, C., Nomura, F., Yukimasa, N., Itoga, S., Yamada-Osaki, M., Sumazaki, R., and Nakai, T. (1999). Transfusion Transmitted virus infection in China: prevalence in blood

donors and in patient with liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **14**, 899-903.

Hartmann, G. and A.M Krieg. (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Therapy*. **6**, 893-903.

Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. **408**, 740-45

Hijikata, M., Takahashi, K. and Mishiro, S. (1999). Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* **260**, 17-22.

Hino, S. (2002). TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* **12**, 151-8.

Hirata, D., Kaneko, N., Iwamoto, M., Yoshio, T., Okazaki, H., Mimori, A., Masuyama, J. and Minota, S. (1998). Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **37**, 1361-2.

Hsieh, S. Y., Wu, Y. H., Ho, Y. P., Tsao, K. C., Yeh, C. T. and Liaw, Y. F. (1999). High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J Clin Microbiol* **37**, 1829-31.

Ikeda, H., Takasu, M., Inoue, K., Okamoto, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1999). Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol* **30**, 205-12.

Irving, W. L., Ball, J. K., Berridge, S., Curran, R., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Neal, K. R., Ryder, S. D. and Thomson, B. J. (1999). TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence, and sequence heterogeneity. *J Infect Dis* **180**, 27-34.

Itoh, K., Hirakawa, K., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, H., Sawada, N., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1999a). Infection by an unenveloped DNA virus associated with non-A to -G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels. *Transfusion* **39**, 522-6.

Itoh, K., Takahashi, M., Ukita, M., Nishizawa, T. and Okamoto, H. (1999b). Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **180**, 1750-1.

Itoh, Y., Takahashi, M., Fukuda, M., Shibayama, T., Ishikawa, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Nishizawa, T. and Okamoto, H. (2000). Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 718-24.

Iwata, N., Fujino, M., Tuchiya, K., Iwata, A., Otaki, Y. and Ueda, S. (1998). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant chicken anemia virus proteins expressed in a baculovirus vector system. *J Vet Med Sci* **60**, 175-80.

Jacob, T., Walker PS., Krieg, AM., Udey. MC. and Vogel, JC. (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG containing oligodeoxynucleotides: a role of dendritic cells in the augmentation of Th-1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* **161**, 3042-49.

Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., Zur Hausen, H. and de Villiers, E. M. (2004). Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* **78**, 7498-507.

Jiang, R. L., Lu, Q., Luo, K. X. and Tan, F. M. (1999). A prospective study of transfusion-transmitted virus transmission by blood transfusion. *J Viral Hepat* **6**, 49-51.

Kakkola, L., Hedman, K., Vanrobaeys, H., Hedman, L. and Soderlund-Venermo, M. (2002). Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. *J Gen Virol* **83**, 979-90.

Kamada K., Kamahora T., Kabat, P. and Hino, S. (2004). Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* **10**, 341-348.

Kamahora, T., Hino, S. and Miyata, H. (2000). Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol* **74**, 9980-6.

Kanda, T., Yokosuka, O., Ikeuchi, T., Seta, T., Kawai, S., Imazeki, F. and Saisho, H. (1999a). The role of TT virus infection in acute viral hepatitis. *Hepatology* **29**, 1905-8.

Kanda, Y., Chiba, S., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Asai, T., Izutsu, K., Yuji, K., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Chiba, S., Yazaki, Y. and Hirai, H. (1999b). TT virus in frequently transfused patients. *Am J Med* **106**, 116-7.

Kao, J. H., Chen, W., Hsiang, S. C., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (1999). Prevalence and implication of TT virus infection: minimal role in patients with non-A-E hepatitis in Taiwan. *J Med Virol* **59**, 307-12.

Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2000). TT virus infection in patients with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features. *J Med Virol* **60**, 387-92.

Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2002). Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis* **185**, 389-92.

Karlin, S., W. Doerfler, and L. R. Cardon. (1994). Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic

viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *J.Virol.* **68**, 2889-97.

Kato, T., Mizokami, M., Mukaide, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Tanaka, Y., Kato, H., Sugauchi, F., Ueda, R., Hirashima, N., Shimamatsu, K., Kage, M. and Kojiro, M. R. (2000). Development of a TT virus DNA quantification system using real-time detection PCR. *J Clin Microbiol* **38**, 94-8.

Kazi, A., Miyata, H., Kurokawa, K., Khan, M. A., Kamahora, T., Katamine, S. and Hino, S. (2000). High frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy. *Arch Virol* **145**, 535-40.

Kikuchi, K., Miyakawa, H., Abe, K., Kako, M., Katayama, K., Fukushi, S. and Mishiro, S. (2000). Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol* **61**, 165-70.

Klinman, D.M., A.-K. Yi, S.L. Beaucage, J. Conover and A.M Krieg. (1996). CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **7**, 2879-83.

Kooistra, K., Zhang, YH., Henriquez, NV., Weiss, B., Mumberg, D., and Noteborn, MH. (2004) TT virus- derived apoptosis- inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma- derived cell. *J Gen Virol* **85**, 1445-50

Krekulova, L., Rehak, V., Killoran, P., Madrigal, N. and Riley, L. W. (2001). Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *J Clin Virol* **23**, 31-41.

Krieg, A.M., A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzky and D. M. Klinman. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. **374**, 546-49.

Krieg, A.M., T. Wu, R. Weeratna, S.M. Efler, L. Love-Homan, L.Yang, A.-K. Yi, D. Short and H.L. Davis. (1998). Sequence motif in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. **95**, 12631-636.

Krieg, A.M. (1999). Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochim.Biophys Acta*. **1489**, 107-16.

Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. **20**, 709-60.

Leary, T. P., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Desai, S. M. and Mushahwar, I. K. (1999). Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* **80**, 2115-20.

Lee, J., T-H. Chuang, V. Redecke, L. She, P.M. Pitha, D.A. Carson, E. Raz and H.B. Cottam. (2003). Molecular basis for immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs:

Activation of Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. **100**, 6646-51.

Lefrère, J. J., Roudot-Thoraval, F., Lefrere, F., Kahfer, A., Mariotti, M., Lerable, J., Thauvin, M., Lefevre, G., Rouger, P. and Girot, R. (1999). Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* **95**, 347-51.

Liang, H., Y. Nishioka, C.F. Reich, D.S. Pisetsky and P.E. Lipsky. (1996). Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J.Clin.Invest.* **98**, 1119-29.

Lisitsyn, N. and Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-51.

Liu, C. J., Kao, J. H., Chen, W., Tsai, R. J., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2000). Interspousal transmission of TT virus: low efficiency and lack of apparent risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* **15**, 1287-91.

Lopez-Alcorocho, J. M., Mariscal, L. F., de Lucas, S., Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Castillo, I., Bartolome, J., Herrero, M., Manzano, M. L., Pardo, M. and Carreno, V. (2000). Presence of TTV DNA in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepat* **7**, 440-7.

Lunderberg, P., P. Welandre, Han, X. and Cantin,E. (2003). Herpes Simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J.Virol.* **77**, 11158-69.

Luo, K. X., Zhang, L., Wang, S. S., Nie, J., Yang, S. C., Liu, D. X., Liang, W. F., He, H. T. and Lu, Q. (1999). An outbreak of enterically transmitted non-A, non-E viral hepatitis. *J Viral Hepat* **6**, 59-64.

MacFarlane, D.E. and. Manzel, L.. (1998). Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J.Immunol.* **160**, 1122-31.

Maggi, F., Fornai, C., Morrica, A., Casula, F., Vatteroni, M. L., Marchi, S., Ciccorossi, P., Riente, L., Pistello, M. and Bendinelli, M. (1999). High prevalence of TT virus viremia in italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *J Infect Dis* **180**, 838-42.

Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M. L., Siciliano, G., Menichetti, F., Tascini, C., Specter, S., Pistello, M. and Bendinelli, M. (2001a). Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *J Med Virol* **65**, 418-22.

Maggi, F., Fornai, C., Zaccaro, L., Morrica, A., Vatteroni, M. L., Isola, P., Marchi, S., Ricchiuti, A., Pistello, M. and Bendinelli, M. (2001b). TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV

replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* **64**, 190-4.

Maggi, F., Pistello, M., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Isola, P., Fornai, C., Fagnani, S., Andreoli, E., Antonelli, G. and Bendinelli, M. (2001c). Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol* **75**, 11999-2004.

Maggi, F., Pifferi, M., Fornai, C., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M. and Bendinelli, M. (2003a). TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol* **77**, 2418-25.

Maggi, F., Pifferi, M., Tempestini, E., Fornai, C., Lanini, L., Andreoli, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M. and Bendinelli, M. (2003b). TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *J Virol* **77**, 9081-3.

Maggi, F., Tempestini, E., Lanini, L., Andreoli, E., Fornai, C., Giannecchini, S., Vatteroni, M., Pistello, M., Marchi, S., Ciccorossi, P., Specter, S. and Bendinelli, M. (2005). Blood levels of TT virus following immune stimulation with influenza or hepatitis B vaccine. *J Med Virol* **75**, 358-65.

Maggi, F., Andreoli, E., Riente, L., Meschi, S., Rocchi, J., Delle Sedie, A., Vatteroni, M., Ceccherini-Nelli, L.,

Specter, S. and Bendinelli, M. (2007). Torquetenovirus in patients with arthritis . *Rheumatology* **46**, 885-6.

Manni, F., Rotola, A., Caselli, E., Bertorelle, G. and Di Luca, D. (2002). Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. *J Mol Evol* **55**, 563-72.

Mariscal, L. F., Lopez-Alcorocho, J. M., Rodriguez-Inigo, E., Ortiz-Movilla, N., de Lucas, S., Bartolome, J. and Carreno, V. (2002). TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* **301**, 121-9.

Martinez, N. M., Garcia, F., Alvarez, M., Bernal, M. C., Piedrola, G., Hernandez, J. and Maroto, M. C. (2000). TT virus DNA in serum, peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. *Aids* **14**, 1464-6.

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Akbar, S. M., Torisu, M. and Onji, M. (2000). Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* **43**, 16-9.

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Kihana, T., Yano, M., Mori, T. and Onji, M. (2001). Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol Res* **21**, 280-287.

Matsumoto, A., Yeo, A. E., Shih, J. W., Tanaka, E., Kiyosawa, K. and Alter, H. J. (1999). Transfusion-associated

TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* **30**, 283-8.

Messina, J.P., G.S. Gilkeson and D.S. Pisetsky. (1991). Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Natl. Cancer Inst.* **147**, 1759-64.

Mikuni, M., Moriyama, M., Tanaka, N., Abe, K. and Arakawa, Y. (2002). SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *J Med Virol* **67**, 624-9.

Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. and Hino, S. (1999). Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* **73**, 3582-6.

Moen, E. M., Sleboda, J. and Grinde, B. (2002a). Real-time PCR methods for independent quantitation of TTV and TLMV. *J Virol Methods* **104**, 59-67.

Moen, E. M., Sleboda, J. and Grinde, B. (2002b). Serum concentrations of TT virus and TT virus-like mini virus in patients developing AIDS. *Aids* **16**, 1679-82.

Moriyama, M., Matsumura, H., Shimizu, T., Shioda, A., Kaneko, M., Miyazawa, K., Miyata, H., Tanaka, N., Uchida, T. and Arakawa, Y. (2001). Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *J Med Virol* **64**, 74-81.

Morrica, A., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Fornai, C., Pistello, M., Ciccorossi, P., Grassi, E., Gennazzani, A. and Bendinelli, M. (2000). TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis* **181**, 803-4.

Muljono, D. H., Nishizawa, T., Tsuda, F., Takahashi, M. and Okamoto, H. (2001). Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch Virol* **146**, 1249-66.

Mushahwar, I. K., Erker, J. C., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Birkenmeyer, L. G., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J. and Dexai, S. M. (1999). Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3177-82.

Mushahwar, I. K. (2000). Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol* **62**, 399-404.

Nakagawa, N., Ikoma, J., Ishihara, T., Yasui-Kawamura, N., Fujita, N., Iwasa, M., Kaito, M., Watanabe, S. and Adachi, Y. (2000). Biliary excretion of TT virus (TTV). *J Med Virol* **61**, 462-7.

Nakano, T., Park, Y. M., Mizokami, M., Choi, J. Y., Orito, E., Ohno, T., Kato, T., Kondo, Y., Tanaka, Y., Kato, H., Kato, T. and Kim, B. S. (1999). TT virus infection among blood donors

and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol* **30**, 389-93.

Naoumov, N. V., Petrova, E. P., Thomas, M. G. and Williams, R. (1998). Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* **352**, 195-7.

Naoumov, N. V. (2000). TT virus--highly prevalent, but still in search of a disease. *J Hepatol* **33**, 157-9.

Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J. and Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-7.

Niel, C., de Oliveira, J. M., Ross, R. S., Gomes, S. A., Roggendorf, M. and Viazov, S. (1999). High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* **57**, 259-63.

Niel, C., Saback, F. L. and Lampe, E. (2000). Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* **38**, 1926-30.

Niel, C. and Lampe, E. (2001). High detection rates of TTV-like mini virus sequences in sera from Brazilian blood donors. *J Med Virol* **65**, 199-205.

Ninomiya, M., T. Nishizawa, M. Takahashi, F. R. Lorenzo, T. Shimosegawa and H. Okamoto. (2007). Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J.Gen.Virol.* **88**, 1939-44.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 92-7.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Tsuda, F., Aikawa, T., Sugai, Y., Konishi, K., Akahane, Y., Ukita, M., Tanaka, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1999). Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* **73**, 9604-8.

Noteborn, M. H., Verschueren, C. A., Zantema, A., Koch, G. and van der Eb, A. J. (1994). Identification of the promoter region of chicken anemia virus (CAV) containing a novel enhancer-like element. *Gene* **150**, 313-8.

Oguchi, T., Tanaka, E., Orii, K., Kobayashi, M., Hora, K. and Kiyosawa, K. (1999). Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. *J Gastroenterol* **34**, 234-40.

Ohto, H., Ujiie, N., Takeuchi, C., Sato, A., Hayashi, A., Ishiko, H., Nishizawa, T. and Okamoto, H. (2002). TT virus infection during childhood. *Transfusion* **42**, 892-8.

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1998a). Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non A-G hepatitis. *J Med Virol* **56**, 128-32

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, Y., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1998b). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* **10**, 1-16.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1999). Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* **259**, 428-36.

Okamoto, H., Fukuda, M., Tawara, A., Nishizawa, T., Itoh, Y., Hayasaka, I., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (2000a). Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *J Virol* **74**, 1132-9.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T. and Sugai, Y. (2000b). TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 700-7.

Okamoto, H., Takahashi, M., Kato, N., Fukuda, M., Tawara, A., Fukuda, S., Tanaka, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (2000c). Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* **74**, 10236-9.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Sugai, Y., Sai, T., Tanaka, T. and Tsuda, F. (2000d). Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 700-707.

Okamoto, H. and Mayumi, M. (2001). TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *J Gastroenterol* **36**, 519-29.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F. and Yoshikawa, A. (2001). Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* **288**, 358-68.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y. and Yoshikawa, A. (2002). Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* **83**, 1291-7.

Okamura, A., Yoshioka, M., Kubota, M., Kikuta, H., Ishiko, H. and Kobayashi, K. (1999). Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* **58**, 174-7.

Okamura, A., Yoshioka, M., Kikuta, H., Kubota, M., Ma, X., Hayashi, A., Ishiko, H. and Kobayashi, K. (2000). Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J Med Virol* **62**, 104-8.

Ott, C., Duret, L., Chemin, I., Trepo, C., Mandrand, B. and Komurian-Pradel, F. (2000) Use of TT virus ORF-1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol* **81**, 2949-58.

Peng, Y. H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A. and Okamoto, H. (2002). Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* **147**, 21-41.

Peters, M. A., Jackson, D. C., Crabb, B. S. and Browning, G. F. (2002). Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem* **277**, 39566-73.

Pirovano, S., Bellinzoni, M., Ballerini, C., Cariani, E., Duse, M., Albertini, A. and Imberti, L. (2002a). Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *J Med Virol* **66**, 421-7.

Pirovano, S., Bellinzoni, M., Matteelli, A., Ballerini, C., Albertini, A. and Imberti, L. (2002b). High prevalence of a variant of SENV in intravenous drug user HIV-infected patients. *J Med Virol* **68**, 18-23.

Pistello, M., Morrica, A., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Freer, G., Fornai, C., Casula, F., Marchi, S., Ciccorossi, P., Rovero, P. and Bendinelli, M. (2001). TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *J Med Virol* **63**, 189-95.

Pollicino, T., Raffa, G., Squadrito, G., Costantino, L., Cacciola, I., Brancatelli, S., Alafaci, C., Florio, M. G. and Raimondo, G. (2002). TT virus has ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. *J Viral Hepat* **10**, 95-102.

Prescott, L. E. and Simmonds, P. (1998). Global distribution of transfusion-transmitted virus. *N Engl J Med* **339**, 776-7.

Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K. and Pintel, D. J. (2005). Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J Virol* **79**, 6505-10.

Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J. E., Markowitz, M., Moore, J. P., Perelson, A. S. and Ho, D. D. (1999). Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet* **354**, 1782-5.

Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Bartolome, J., Ortiz-Movilla, N., Lopez-Alcorocho, J. M., Herrero, M., Manzarbeitia, F., Oliva, H. and Carreno, V. (2000). Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Pathol* **156**, 1227-34.

Saback, F. L., Gomes, S. A. and Niel, C. (2002). High frequency of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* **101**, 117-25.

Schroter, M., Polywka, S., Zollner, B., Schafer, P., Laufs, R. and Feucht, H. H. (2000). Detection of TT virus DNA and GB virus type C/Hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol* **38**, 745-7.

Shang, D., Lin, Y. H., Rigopoulou, I., Chen, B., Alexander, G. J. and Allain, J. P. (2000). Detection of TT virus DNA in patients with liver disease and recipients of liver transplant. *J Med Virol* **61**, 455-61.

Shibata, M., Morizane, T., Baba, T., Inoue, K., Sekiyama, K., Yoshiba, M. and Mitamura, K. (2000). TT virus infection in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* **95**, 3602-6.

Shibata, M., Wang, R. Y., Yoshiba, M., Shih, J. W., Alter, H. J. and Mitamura, K. (2001). The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* **184**, 400-4.

Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F. and Okamoto, H. (2001). Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Aids* **15**, 563-70.

Shoya, Y., Kobayashi, T., Koda, T., Ikuta, K., Kakinuma, M. and Kishi, M. (1998). Two proline-rich nuclear localization

signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* **72**, 9755-62.

Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Prescott, L. E., MacDonald, D. M., Ellender, J., Yap, P. L., Ludlam, C. A., Haydon, G. H., Gillon, J. and Jarvis, L. M. (1998). Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* **352**, 191-5.

Simmonds, P. (2002). TT virus infection: a novel virus-host relationship. *J Med Microbiol* **51**, 455-8.

Stark, K., Poggensee, G., Hohne, M., Bienzle, U., Kiwelu, I. and Schreier, E. (2000). Seroepidemiology of TT virus, GBC-C/HGV, and hepatitis viruses B, C, and E among women in a rural area of Tanzania. *J Med Virol* **62**, 524-30.

Suzuki, F., Chayama, K., Tsubota, A., Akuta, N., Someya, T., Kobayashi, M., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K. and Kumada, H. (2001). Pathogenic significance and organic virus levels in patients infected with TT virus. *Intervirology* **44**, 291-7.

Suzuki, T., Suzuki, R., Li, J., Hijkata, M., Matsuda, M., Li, T. C., Matsuura, Y., Mishiro, S. and Miyamura, T. (2004). Identification of Basal Promoter and Enhancer elements in a untranslated region of the TT virus genome. *J Virol* **78**, 10820-4.

Szladek, G., Juhasez, A., Asztalos, L., Szoke, K., Murvai, M., Szarka, K., Veress, G., Gergely, L., and Konya, J. (2003).

Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. *Arch Virol* **148**, 841-51.

Tajiri, H., Tanaka, T., Sawada, A., Etani, Y., Kozaiwa, K., Mushiake, S. and Mishiro, S. (2001). Three cases with TT virus infection and idiopathic neonatal hepatitis. *Intervirology* **44**, 364-9.

Takahashi, K., Hoshino, H., Ohta, Y., Yoshida, N. and Mishiro, S. (1998a). Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatol Res* **12**, 233-9.

Takahashi, K., Ohta, Y. and Mishiro, S. (1998b). Partial -2,4 kb sequences of TT virus (TTV) genome from eight Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implication. *Hepatol Res* **12**, 111-20.

Takahashi, K., Hijikata, M., Samokhvalov, E. I. and Mishiro, S. (2000a). Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* **43**, 119-23.

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M. and Mishiro, S. (2000b). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* **145**, 979-93.

Takahashi, M., Asabe, S., Gotanda, Y., Kishimoto, J., Tsuda, F. and Okamoto, H. (2002). TT virus is distributed in

various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 242-8.

Takayama, S., Miura, T., Matsuo, S., Taki, M. and Sugii, S. (1999a). Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol* **104**, 626-9.

Takayama, S., Yamazaki, S., Matsuo, S. and Sugii, S. (1999b). Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 208-11.

Tanaka, M., Nishiguchi, S., Tanaka, T., Enomoto, M., Takeda, T., Shiomi, S., Kuroki, T. and Otani, S. (1999). Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J Gastroenterol* **34**, 589-93.

Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Iida, S. and Ueda, R. (2000a). Lack of integrated TT virus (TTV) genomes in cellular DNA in infected human hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* **38**, 411-7.

Tanaka, Y., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Hayashi, K., Kato, T., Mukaide, M., Iida, S. and Mizokami, M. (2000b). Identification of a novel 23kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes. *Arch Virol* **145**, 1385-98.

Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T. and Okamoto, H. (2000). Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 470-6.

Todd, D., Creelan, J. L., Mackie, D. P., Rixon, F. and McNulty, M. S. (1990). Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* **71** (Pt 4), 819-23.

Todd, D., McNulty, M. S., Adair, B. M. and Allan, G. M. (2001). Animal circoviruses. *Adv Virus Res* **57**, 1-70.

Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B. and Teo, C. G. (2002). Circovirus classification: past, present and future. XIIth International Congress of Virology. Paris, July 27 – August 1, 2002.

Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Hebisawa, A., Takahashi, M. and Okamoto, H. (2001a). Influence of TT virus on the histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* **19**, 197-211.

Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M. and Okamoto, H. (2001b). Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease. *Hepatol Res* **20**, 288-300.

Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Tawara, A., Takahashi, M. and Okamoto, H. (2001c). Influence of TT virus on the clinical course of alcoholic liver disease. *Hepatol Res* **19**, 180-193.

Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M. and Okamoto, H. (2002). High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Med Virol* **67**, 501-9.

Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka T.Sudo et al. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J .Natl.Cancer Inst.* **72**, 955-62.

Toniutto, P., Fabris, C., Falletti, E., Lombardelli, T., Gasparini, V., Barillari, G., Biffoni, F. and Pirisi, M. (1999). Evidence against a direct role played by transfusion-transmitted virus infection in causing hepatic or hematologic manifestations. *Blood* **93**, 2426-7.

Touinssi, M., Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Vialettes, B., Berland, Y., Tamalet, C., Dhiver, C., Ravaux, I., De Micco, P. and De Lamballerie, X. (2001). TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J Clin Virol* **21**, 135-41.

Toyoda, H., Nomura, C., Watanabe, M., Takahama, K., Hobara, R., Yokozaki, S., Fukuda, Y. and Nakano, H. (2000). Investigation of the association between infection with *Helicobacter pylori* and with TT virus, a novel DNA virus, in patients with gastroduodenal ulcer or ulcer scar. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **12**, 1289-93.

Tsuda, F., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1999). Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* **77**, 199-206.

Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H. and Okamoto, H. (2001). IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepatol Res* **19**, 1-11.

Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1999). Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associate with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* **179**, 1245-48.

Ukita, M., Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (2000). The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol* **145**, 1543-59.

Umemura, T., Alter, H. J., Tanaka, E., Yeo, A. E., Shih, J. W., Orii, K., Matsumoto, A., Yoshizawa, K. and Kiyosawa, K.

(2001a). Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis* **184**, 1246-51.

Umemura, T., Tanaka, Y., Kiyosawa, K., Alter, H. J. and Shih, J. W. K. (2001b). Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Letters* **25640**, 1-4.

Vasconcelos, H. C., Cataldo, M. and Niel, C. (2002). Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like mini virus isolates. *J Med Virol* **68**, 291-8.

Verschoor, E. J., Langenhuijzen, S. and Heeney, J. L. (1999). TT viruses (TTV) of non-human primates and their relationship to the human TTV genotypes. *J Gen Virol* **80**, 2491-9.

Viazov, S., Ross, R. S., Niel, C., de Oliveira, J. M., Varenholz, C., Da Villa, G. and Roggendorf, M. (1998). Sequence variability in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types. *J Gen Virol* **79**, 3085-9.

Vihinene-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P. and Vuento, M. (1997). Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem* **250**, 389-94.

Voolmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L. and Krieg, A. M. (2004). Characterization of three CpG

oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* **34**, 251-62.

Wagner, H. (1999) Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* **73**, 329-68.

Whalley, S. A., Murray, J. M., Brown, D., Webster, G. J., Emery, V. C., Dusheiko, G. M. and Perelson, A. S. (2001). Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* **193**, 847-54.

White, P. A., Li, Z., Zhai, X., Marinos, G. and Rawlinson, W. D. (2000). Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA). *Virology* **271**, 382-9.

Wilkström, FH., Meehan, BM., Berg, M., Timmusk, S., Elvin, J., Fuxler, L., Magnusson, M., Allan, GM., McNeilly F. and Fossum, C. (2007) Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* **81**, 4919-27.

Wilson, L. E., Umemura, T., Astemborski, J., Ray, S. C., Alter, H. J., Strathdee, S. A., Vlahov, D. and Thomas, D. L. (2001). Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. *J Infect Dis* **184**, 1315-9.

Worobey, M. (2000). Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol* **74**, 7666-70.

Yamada-Osaki, M., Sumazaki, R., Noguchi, E., Shibasaki, M. and Matsui, A. (1998). Transfusion transmitted virus. *Lancet* **352**, 1309-10; author reply 1310-1.

Yamada, H., Gursel, I., Takeshita, F.; Conover, J., Ishii, KJ., Gursel, M., Takeshita, S. and Klinman DM. (2002) Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J Immunol* **169**, 5590-4.

Yi, A. -K., D. M. Klinman, T.L. Martin, S. Matson and A.M. Krieg.(1996).Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J. Immunol.* **157**, 5394-5402.

Yi, A. -K.,Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirch, J. and Krieg AM. (1998) CpG motifs in bacterial DANN activate leukocyte through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* **160**, 4755-61.

Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H. and Iwakura, Y. (2002). Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J Gen Virol* **83**, 141-50.

Yokozaki, S., Fukuda, Y., Nakano, I. and Katano, Y. (1999a). TT virus: a mother-to-child transmitted rather than bloodborne virus. *Blood* **93**, 3569-70.

Yokozaki, S., Toyoda, H., Nakano, I., Katano, Y., Ebata, M., Fukuda, Y., Takamatsu, J., Saito, H. and Hayakawa, T. (1999b). Infection with TT virus, a novel transfusion-

transmissible DNA virus, in haemophiliacs and in blood products. *Br J Haematol* **105**, 1114-9.

Yoshida, H., Kato, N., Shiratori, Y., Shao, R., Wang, Y., Shiina, S. and Omata, M. (2002). Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *J Clin Microbiol* **40**, 3140-5.

Yu, Q., Shiramizu, B., Nerurkar, V. R., Hu, N., Shikuma, C. M., Melish, M. E., Cascio, K., Imrie, A., Lu, Y. and Yanagihara, R. (2002). TT virus: preferential distribution in CD19(+) peripheral blood mononuclear cells and lack of viral integration. *J Med Virol* **66**, 276-84.

Yuki, N., Kato, M., Masuzawa, M., Ishida, H., Inoue, T., Tabata, T., Matsushita, Y., Kishimoto, H., Sasaki, Y., Hayashi, N. and Hori, M. (1999). Clinical implications of coinfection with a novel DNA virus (TTV) in hepatitis C virus carriers on maintenance hemodialysis. *J Med Virol* **59**, 431-6.

Zhong, S., Yeo, W., Tang, M., Liu, C., Lin, X. R., Ho, W. M., Hui, P. and Johnson, P. J. (2002). Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol* **66**, 428-34.

CURRICULUM

PUBBLICAZIONI IN ESTESO

1. Maggi F., M. Pifferi, ML. Vatteroni, C. Fornai, E. Tempestini, S. Anzilotti, **L. Lanini**, E. Andreoli, V. Ragazzo, M. Pistello, S. Specter, M. Bendinelli: "*Human metapneumovirus in respiratory tract infections in a three year study of nasal swabs from infants in Italy*". **Journal of Clinical Microbiology**, 2003; 41:2987-2991.
2. Maggi F., S. Marchi, C. Fornai, E. Tempestini, E. Andreoli, **L. Lanini**, ML. Vatteroni, M. Bellini, N. de Bortoli, F. Costa, M. Pistello, S. Specter, M. Bendinelli: "*Relationship of TT virus and Helicobacter pylori infections in gastric tissues of patients with gastritis*". **Journal of Medical Virology**, 2003; 71:160-165.
3. Maggi F., M. Pifferi, E. Tempestini, C. Fornai, **L. Lanini**, E. Andreoli, ML. Vatteroni, S. Presciuttini, A. Pietrobelli, A. Boner, M. Pistello, M. Bendinelli: "*TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases*". **Journal of Virology**, 2003; 77:9081-9083.
4. Maggi F., C. Fornai, E. Tempestini, E. Andreoli, **L. Lanini**, ML. Vatteroni, M. Pistello, S. Marchi, G. Antonelli, M. Bendinelli: "*Relationships between TT virus infection and hepatitis C virus response to interferon therapy in doubly infected patients*". **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, 2003; 17:176-182.

5. Maggi F., M. Pifferi, E. Tempestini, **L. Lanini**, E. De Marco, C. Fornai, E. Andreoli, S. Presciuttini, ML. Vatteroni, M. Pistello, V. Ragazzo, P. Macchia, A. Pietrobelli, A. Boner, M. Bendinelli. *"Correlation between Torquetenovirus infection and serum levels of eosinophil cationic protein in children hospitalized for acute respiratory diseases"*. **Journal of Infectious Diseases**, 2004; 190:971-974.
6. Maggi F., E. Tempestini, **L. Lanini**, E. Andreoli, C. Fornai, S. Gianecchini, ML. Vatteroni, M. Pistello, S. Marchi, P. Chiccorossi, S. Specter, M. Bendinelli. *"Blood levels of TT virus following immune stimulation with influenza or hepatitis B vaccine"*. **Journal of Medical Virology**, 2005; 75:358-365.
7. Pifferi M., F. Maggi, E. Andreoli, **L. Lanini**, E. De Marco, C. Fornai, ML. Vatteroni, M. Pistello, V. Ragazzo, P. Macchia, A. Boner, M. Bendinelli: *"Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma"*. **Journal Infectious Diseases**, 2005; 192: 1141-1148.
8. Maggi F., E. Andreoli, **L. Lanini**, C. Fornai, ML Vatteroni, M. Pistello, S. Presciuttini, M. Bendinelli. *"Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried"*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005; 43: 4807-10.

ABSTRACT

1. Maggi, F., M. Pifferi, C. Fornai, E. Andreoli, E. Tempestini, ML. Vatteroni, **L. Lanini**, S. Presciuttini, A. Pietrobelli, A. Boner, M. Pistello, M. Bendinelli: *“Indagini sui virus del gruppo TT come agenti di infezioni respiratorie nell’infanzia”*. **Bollettino della SIM 2002**; 1:50. Catania, 6-9 Ottobre 2002.
2. Maggi, F., E. Tempestini, M. Pifferi, C. Fornai, E. Andreoli, ML. Vatteroni, **L. Lanini**, S. Presciuttini, M. Pistello, M. Bendinelli: *“Livelli del virus TT in neonati con infezioni respiratorie acute”*. **V Workshop Italiano di PCR Quantitativa**. Firenze, 19 Dicembre 2002.
3. Maggi, F., M. Pifferi, ML. Vatteroni, C. Fornai, E. Tempestini, S. Anzilotti, **L. Lanini**, E. Andreoli, V. Ragazzo, M. Pistello, S. Specter, M. Bendinelli: *“Human metapneumovirus is frequently detected in the circulation of infected children”*. **Nineteenth Annual Clinical Virology Symposium and Annual Meeting Pan American Society for Clinical Virology** S28. Clearwater Beach, FL-USA, 27-30 Aprile 2003.
4. Maggi, F., M. Pifferi, ML. Vatteroni, C. Fornai, E. Tempestini, S. Anzilotti, **L. Lanini**, E. Andreoli, V. Ragazzo, S. Specter, M. Pistello, M. Bendinelli: *“Human metapneumovirus is frequently found in plasma of infected children”*. **XII International Conference on Negative Strand Viruses**, n. 294. Pisa, 14-19 Giugno 2003.

5. Maggi, F., M. Pifferi, E. Tempestini, C. Fornai, **L. Lanini**, E. Andreoli, ML. Vatteroni, S. Presciuttini, M. Pistello, M. Bendinelli: *"First evidence implicating TT virus as an immunomodulatory agent"*. **3° Congresso Nazionale della Società Italiana di Virologia (SIV)**. Cortona (AR), 22-24 Settembre 2003.
6. Maggi, F., M. Pifferi, E. Tempestini, C. Fornai, **L. Lanini**, E. Andreoli, ML. Vatteroni, S. Presciuttini, M. Pistello, M. Bendinelli: *"Attività immunomodulante di TTV: prima evidenza in bambini con patologie respiratorie"*. **Bollettino della SIM 2003, 89**. Roma, 19-22 Ottobre 2003.
7. Pistello, M., F. Maggi, M. Pifferi, C. Fornai, E. Tempestini, E. Andreoli, **L. Lanini**, , ML. Vatteroni, M. Bendinelli: *"Investigation in the clinical significance of TTV"*. **Annual Meeting of the Gesellschaft für Virologie Joint Meeting With the Società Italiana di Virologia**. Tübingen (Germany), 17-20 Marzo 2004.
8. Maggi F., M. Pifferi, E. Andreoli, **L. Lanini**, C. Fornai, ML. Vatteroni, E. Tempestini, S. Presciuttini, M. Pistello, M. Bendinelli: *"Correlation between TT Virus infection and levels of eosinophil cationic protein in children with acute respiratory diseases"*. **IV national Congress of the Italian Society of Virology**. Orvieto, 20-22 Settembre 2004.
9. Maggi F., M. Pifferi, ML. Vatteroni, C. Fornai, E. Tempestini, S. Anzilotti, **L. Lanini**, E. Andreoli, V. Ragazzo, M. Pistello,

- S. Specter, M. Bendinelli: *"Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy"*. **Clinical Laboratory**, 2004, 50:372.
10. Fornai C., F. Maggi, M. Pifferi, **L. Lanini**, E. Andreoli, ML. Vatteroni, S. Presciuttini, M. Pistello, M. Bendinelli: *"Associazione fra TTV e parametri di funzione respiratoria e infiammazione in bambini con asma"*. **2° Congresso Nazionale SIVIM**. Roma, 16-18 Maggio 2005.
11. Maggi F., M. Pifferi, E. Andreoli, **L. Lanini**, C. Fornai, ML. Vatteroni, M. Pistello, P. Macchia, A. Boner, M. Bendinelli: *"Nasal TT virus burdens and lung function in asthmatic children"*. **XIII International Congress of Virology**. San Francisco, California-USA, 23-28 Luglio 2005.
12. Maggi F., E. Andreoli, S. Meschi, J. Rocchi, **L. Lanini**, ML. Vatteroni, M. Pistello, M. Bendinelli: *"Relazione fra carichi viremici totali e genogruppi infettanti in soggetti con infezione cronica da TTV"*. **Bollettino della SIM**. Napoli, 16-19 Ottobre 2005; 7:92.
13. Maggi F., E. Andreoli, **L. Lanini**, J. Rocchi, V. Ricci, ML. Vatteroni, M. Albani, L. Ceccherini Nelli, M. Pistello, M. Bendinelli: *"TTV and the host's immune system: light and shade of a new virus-host interaction"*. **3° International ssDNA comparative virology workshop**, Estalagem das Minas Gerais -Ouro Preto (BRASILE), 20-26 Maggio 2007.

14. Bendinelli M., F. Maggi, M. Pifferi, E. Andreoli, **L. Lanini**, J. Rocchi, V. Ricci: *"Looking for possible consequences of anellovirus infections in children"*. **3° International ssDNA comparative virology workshop**, Estalagem das Minas Gerais -Ouro Preto (BRASILE), 20-26 Maggio 2007.
15. Maggi F., E. Andreoli, J. Rocchi, **L. Lanini**, V. Ricci, M. Albani, M. Pifferi, ML. Vatteroni, M. Pistello, L. Ceccherini Nelli, M. Bendinelli: *"Human bocavirus in italian patients with respiratory diseases"*. **7° National Congress of the Italian Society of Virology (SIV)**. Orvieto, 24-25 Giugno, 2007.